

# OXIDATION VON VITAMIN E IN BIOLOGISCHEN SYSTEMEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde  
vorgelegt der  
Philosophischen Fakultät II  
der Universität Zürich

von  
Gabriela Baitella-Eberle  
aus Zürich

Begutachtet von den Herren  
Prof. Dr. R. E. Humbel  
Prof. Dr. K. F. Gey

Zürich 1987  
Zentralstelle der Studentenschaft



# OXIDATION VON VITAMIN E IN BIOLOGISCHEN SYSTEMEN

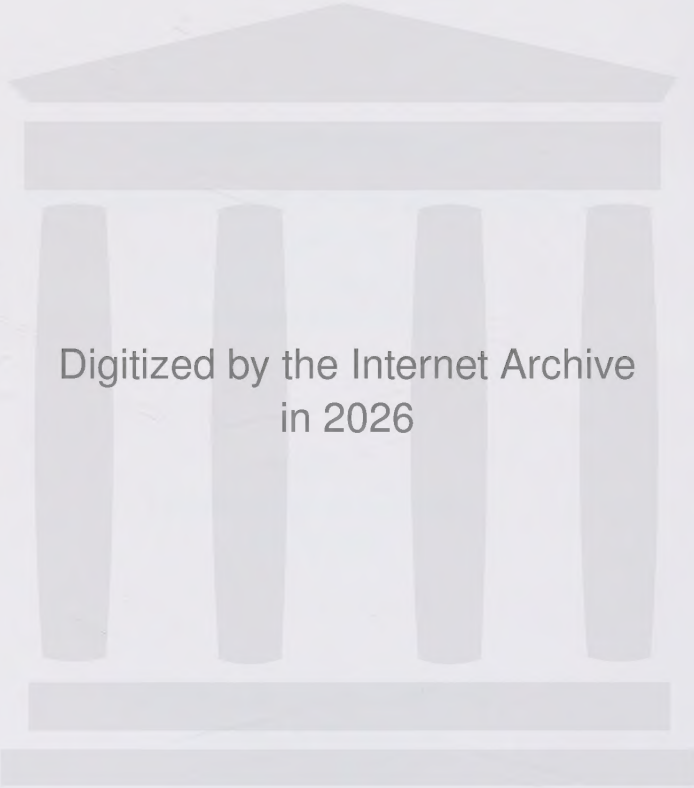
Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde  
vorgelegt der  
Philosophischen Fakultät II  
der Universität Zürich

von  
Gabriela Baitella-Eberle  
aus Zürich

Begutachtet von den Herren  
Prof. Dr. R. E. Humbel  
Prof. Dr. K. F. Gey

Zürich 1987  
Zentralstelle der Studentenschaft



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41507227\\_0022](https://archive.org/details/IA41507227_0022)

Die Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn

Dr. med. P. Tuchschnid

an der Universitäts-Kinderklinik  
Zürich







# INHALTSVERZEICHNIS

=====

## 1. EINLEITUNG

=====

|                                                                    | Seite     |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.1. Tocopherole</b>                                            | <b>1</b>  |
| 1.1.1. Biologische Eigenschaften                                   | 1         |
| 1.1.2. Physikalisch-Chemische Eigenschaften                        | 3         |
| -Vit.E als Antioxidans                                             | 4         |
| 1.1.3. Funktion von Vit.E im Organismus                            | 5         |
| -Mangelsymptome bei Tieren                                         | 5         |
| -Mangelsymptome beim Menschen                                      | 5         |
| <b>1.2. Biochemie von Vit.E</b>                                    | <b>7</b>  |
| 1.2.1. Aufnahme, Transport und Einbau in Zellmembranen             | 7         |
| 1.2.1.1. Aufnahme und Transport                                    | 7         |
| 1.2.1.2. Einlagerung in Zellmembran                                | 8         |
| -Vit.E-Lipid-Wechselwirkungen                                      | 9         |
| -Vit.E-Protein-Wechselwirkungen                                    | 10        |
| 1.2.1.3. Veränderungen der Membraneigenschaften durch Vit.E-Einbau | 10        |
| -Permeabilitätsveränderungen durch Vit.E                           | 11        |
| -Veränderungen der Membranfluidität durch Vit.E                    | 11        |
| 1.2.2. Funktion und Metabolismus von Vit.E                         | 12        |
| 1.2.2.1. Bildung und Wirkung toxischer Radikale                    | 12        |
| -Exogene und endogene Radikale im menschlichen Körper              | 12        |
| -Radikalquellen für "in vitro" Experimente                         | 13        |
| -Radikalinduzierte Veränderungen an Proteinen und Lipiden          | 14        |
| -Auswirkungen auf Membran- und Zelleigenschaften                   | 17        |
| 1.2.2.2. Schutz gegen toxische Radikale                            | 17        |
| -Schutz im Cytoplasma                                              | 17        |
| -Schutz im Plasma und in der Erythrocytenmembran                   | 19        |
| 1.2.2.3. Antioxidative Wirkung von Vit.E in der Zellmembran        | 22        |
| -Reaktion mit Radikalen                                            | 22        |
| -Bildung von Oxidationsprodukten                                   | 23        |
| 1.2.3. Exkretion                                                   | 25        |
| <b>1.3. Fragestellung</b>                                          | <b>27</b> |

## 2. METHODEN

=====

|                                                                                                               | Seite |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.1. Chemikalien und Lösungen                                                                                 | 28    |
| 2.2. Erythrocyten- und Plasmagewinnung aus humanem Vollblut                                                   | 29    |
| 2.3. Extraktion von Lipiden aus Plasma und Erythrocyten                                                       | 29    |
| 2.3.1. Extraktion aus Plasma                                                                                  | 29    |
| 2.3.2. Extraktion aus Erythrocyten                                                                            | 29    |
| 2.3.3. Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) von Vit.E, isoliert aus Plasma und Erythrocyten                 | 29    |
| 2.3.4. Isolierung von Vit.E-Oxidationsprodukten aus Plasma und Erythrocyten                                   | 31    |
| 2.4. Oxidation von Vit.E mit Metallsalzen                                                                     | 31    |
| 2.4.1. Oxidation mit $\text{FeCl}_3$                                                                          | 31    |
| 2.4.2. Oxidation mit $\text{CuSO}_4$                                                                          | 32    |
| 2.4.2.1. Oxidation mit $\text{CuSO}_4$ in Wasser/Alkohol                                                      | 32    |
| 2.4.2.2. Oxidation mit $\text{CuSO}_4$ in Deoxycholat                                                         | 32    |
| 2.5. Oxidation unter physiologischen Bedingungen                                                              | 32    |
| 2.5.1. Oxidation mit dem XOD-System                                                                           | 32    |
| 2.5.2. Xanthin-Bestimmung                                                                                     | 33    |
| 2.5.3. HPLC-Bedingungen zur Trennung von Vit.E und seinen Oxidationsprodukten, hergestellt mit dem XOD-System | 34    |
| 2.5.3.1. Gleichzeitige Darstellung von Vit.E und seinen Oxidationsprodukten                                   | 34    |
| 2.5.3.2. Darstellung der Oxidationsprodukte                                                                   | 35    |
| 2.6. Erythrocyten-Membranen                                                                                   | 36    |
| 2.6.1. Isolierung von Erythrocyten-Membranen                                                                  | 36    |

|                                                                              | Seite |
|------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.6.2. Herstellung von $^3\text{H}$ -Vit.E markierten Erythrocyten-Membranen | 36    |
| <b>2.7. Lipoproteine</b>                                                     | 36    |
| 2.7.1. Isolierung und Reinigung von Lipoproteinen aus menschlichem Plasma    | 36    |
| 2.7.2. Bindung von Vit.E an Serumalbumin und Lipoproteine                    | 38    |
| <b>2.8. Proteinbestimmung</b>                                                | 38    |
| <b>2.9. Sulphydrylgruppentitration</b>                                       | 38    |
| <b>2.10. SDS (Natriumdodecylsulfat)/Polyacrylamid Gelelektrophorese</b>      | 39    |
| <b>2.11. Spektroskopische Messungen</b>                                      | 40    |
| 2.11.1. Absorptionsspektroskopie                                             | 40    |
| 2.11.2. Kernresonanzspektroskopie                                            | 40    |
| 2.11.3. Infrarot-Spektroskopie                                               | 40    |
| 2.11.4. Massenspektrometrie                                                  | 40    |

### 3. ERGEBNISSE

=====

|                                                                                                                           | Seite |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.1. <b>Löslichkeit von Vit.E</b>                                                                                         | 41    |
| 3.2. <b>Oxidation von Vit.E</b>                                                                                           | 45    |
| 3.2.1.    Oxidation in organischen Lösungsmitteln                                                                         | 45    |
| 3.2.1.1. Oxidation mit $\text{FeCl}_3$                                                                                    | 45    |
| 3.2.1.2. Oxidation mit $\text{CuSO}_4$                                                                                    | 47    |
| 3.2.2.    Oxidation unter physiologischen Bedingungen<br>mit dem XOD-System                                               | 51    |
| 3.2.3.    Anwendung der 3 Oxidationssysteme auf Ery-<br>throcyten                                                         | 52    |
| 3.2.4.    Anwendung der 3 Oxidationssysteme auf Ery-<br>throcyten-Membranen                                               | 53    |
| 3.3. <b>Oxidation von Vit.E im Plasma und gebunden<br/>          an Plasmaproteine</b>                                    | 54    |
| 3.3.1.    Oxidation im Plasma                                                                                             | 54    |
| 3.3.2.    Oxidation von Vit.E gebunden an Plasma-<br>proteine                                                             | 55    |
| 3.3.2.1. Oxidation von Vit.E gebunden an Serumalbumin                                                                     | 55    |
| 3.3.2.2. Oxidation von Vit.E gebunden an Lipoproteine                                                                     | 57    |
| 3.4. <b>Uebertragung von Vit.E auf Erythrocyten</b>                                                                       | 60    |
| 3.4.1.    Uebertragung von Vit.E auf Erythrocyten<br>durch Serumalbumin                                                   | 60    |
| 3.4.2.    Uebertragung von Vit.E auf Erythrocyten<br>durch Lipoproteine                                                   | 61    |
| 3.4.2.1. Vit.E-Bindungskapazität der Lipoproteine<br>in vivo im menschlichen Plasma                                       | 61    |
| 3.4.2.2. Uebertragung von lipoproteingebundenem Vit.E<br>im Vergleich zu serumalbumingebundenem Vit.E<br>auf Erythrocyten | 62    |
| 3.5. <b>Oxidation von Vit.E in Erythrocyten-Membranen<br/>          unter physiologischen Bedingungen</b>                 | 64    |

|                                                                                                      | Seite     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.5.1. Oxidation von Erythrocyten-Membranen mit<br>in vivo inkorporiertem Vit.E                      | 64        |
| 3.5.2. Vergleich der Oxidationsprodukte der Ery-<br>cyten-Membranen mit denen aus Deoxycholat        | 66        |
| 3.5.3. Herstellung von Membran-Oxidationsprodukten<br>mit in Deoxycholat solubilisiertem Vit.E       | 69        |
| 3.5.3.1. Kinetik der Oxidationsproduktbildung in<br>Deoxycholat                                      | 69        |
| 3.5.3.2. Isolierung der Oxidationsprodukte                                                           | 72        |
| 3.5.3.3. Spektroskopische Charakterisierung der<br>Oxidationsprodukte                                | 74        |
| -Absorptionsspektroskopie                                                                            | 74        |
| -Massenspektrometrie                                                                                 | 75        |
| -Infrarot-Spektroskopie                                                                              | 77        |
| -Protonen-NMR-Spektroskopie                                                                          | 78        |
| <b>3.6. Stabilität der in Deoxycholat gebildeten<br/>Oxidationsprodukte in intakten Erythrocyten</b> | <b>80</b> |
| 3.6.1. Einbau der Oxidationsprodukte in Erythrocyten                                                 | 80        |
| 3.6.2. Stabilität der Oxidationsprodukte in Ery-<br>throcyten-Membranen                              | 81        |
| 3.6.3. Stimulation der Reduktion von Vit.E-Oxidations-<br>produkten mit Vit.C und Methylenblau       | 82        |

#### 4. DISKUSSION

=====

|                                                                                             | Seite |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 4.1.      Suche nach Vit.E-Oxidationssystemen in<br>wässrigen Lösungen                      | 83    |
| 4.1.1.    Oxidation mit Metallsalzen                                                        | 83    |
| 4.1.2.    Oxidation mit dem XOD-System                                                      | 84    |
| 4.2.      Anwendung der 3 Systeme auf EC und<br>EC-Membranen                                | 85    |
| 4.3.      Suche nach einem System zur Inkorporation<br>von markiertem Vit.E in EC-Membranen | 87    |
| 4.4.      Transport von Vit.E im Plasma und dessen<br>Uebertragung auf Erythrocyten         | 89    |
| 4.5.      Untersuchung der Oxidation von Vit.E im<br>Plasma und in der EC-Membran           | 91    |
| 4.5.1.    Oxidation von Vit.E im Plasma                                                     | 91    |
| 4.5.2.    Oxidation von Vit.E in EC-Membranen                                               | 92    |

#### 5. SCHLUSSFOLGERUNGEN

=====

#### 6. ZUSAMMENFASSUNG

=====

#### 7. DANK

=====

#### 8. LITERATURVERZEICHNIS

=====

## Abkürzungen

|       |                                         |
|-------|-----------------------------------------|
| EC    | Erythrozyten                            |
| Hb    | Hämoglobin                              |
| HK    | Hämatokrit                              |
| Vit.E | Vitamin E                               |
| SA    | Serumalbumin                            |
| HSA   | Humanes Serumalbumin                    |
| BSA   | Bovines Serumalbumin                    |
| VLDL  | Very low density lipoprotein            |
| LDL   | Low density lipoprotein                 |
| HDL   | High density lipoprotein                |
| DOC   | Deoxycholat                             |
| ADH   | Alkohol-Dehydrogenase                   |
| XOD   | Xanthinoxidase                          |
| SOD   | Superoxiddismutase                      |
| CAT   | Katalase                                |
| GPX   | Glutathionperoxidase                    |
| RPX   | Diverse Peroxidasen                     |
| NADP  | Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat |
| DTNB  | 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)     |
| TNB   | 5-Thio-2-nitrobenzoesäure               |
| RT    | Raumtemperatur                          |
| Dpm   | Desintegrationen pro Minute             |
| '     | Minuten                                 |
| UV    | Ultraviolett                            |
| IR    | Infrarot                                |
| NMR   | Magnetische Kernresonanz                |
| MS    | Massenspektrum                          |



## 1. EINLEITUNG

=====

### 1.1. Tocopherole

#### 1.1.1. Biologische Eigenschaften

1922 machte Evans die Feststellung, dass zum normalen Schwangerschaftsablauf und zur Erzielung einer gesunden Nachkommenschaft bei Ratten ein in Oel von Pflanzensamen vorkommender Faktor erforderlich ist. Dieser fettlösliche Wirkstoff wurde später als Vitamin E oder  $\alpha$ -Tocopherol (griechisch: "tocos"=Geburt, "phero"=hervorbringen) bezeichnet [1].

Tocopherole werden in Pflanzen durch Kondensation von Homogentisinsäure (gebildet im Shikiminsäureweg) mit Phityldiphosphat (hydriertes Produkt aus Terpensynthese) und anschließender Zyklisierung und Methylierung synthetisiert [103]. In Pflanzen werden vier verschiedene Tocopherole, die mit den Präfixen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  bezeichnet werden gebildet. Sie unterscheiden sich sowohl chemisch durch unterschiedliche Stellung und Anzahl von Methylgruppen, als auch in ihrer biologischen Aktivität [102] (Abb. 1).

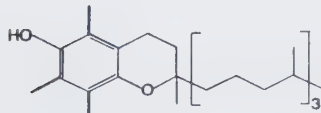
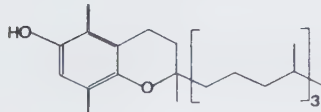
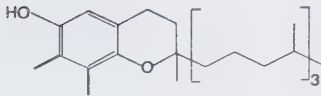
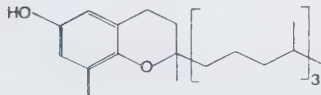
|                                                                                     | Name                           | Biologische Aktivität |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
|    | $\alpha$ -Tocopherol<br>=Vit.E | 100                   |
|   | $\beta$ -Tocopherol            | 40                    |
|  | $\gamma$ -Tocopherol           | 8                     |
|  | $\delta$ -Tocopherol           | 1                     |

Abb.1: Chemische Struktur der Tocopherole und deren biologische Aktivität [102].

Die biologische Aktivität der einzelnen Tocopherole wurde mit dem sogenannten Resorptionssterilitätstest an Ratten bestimmt, der im Folgenden zusammenfassend beschrieben ist. Rattenweibchen werden während 3-4 Monaten tocopherolfrei ernährt. Ohne Zugabe von Tocopherol nach erfolgter Konzeption werden die Föten zwischen dem achten und sechzehnten Tag der Trächtigkeit resorbiert. Durch Verabreichung einer einmaligen oralen Dosis, des zu testenden Tocopherols nach der Konzeption, kann die Mindestmenge bestimmt werden, die die Geburt von normalen Jungen gewährleistet und somit die fötale Resorption verhindert. Mit dieser Methode wurden die relativen biologischen Aktivitäten der in Abbildung 1 dargestellten Tocopherole bestimmt [3].

Die  $\alpha$ -Form der Tocopherole kommt in Nahrungsmitteln und in menschlichen Geweben [101] am häufigsten vor und zeigte die grösste biologische Aktivität. Zu den reichsten  $\alpha$ -Tocopherol- oder Vit.E-Quellen zählen Pflanzenöle, tierische Organe sowie Milch und Butter. Der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt einiger Nahrungsmittel ist in Tabelle 1 zusammengestellt [101,102].

|                                               |                                                                |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Weizenkeimöl<br>Baumwollsaamenöl<br>Erdnussöl | 320.00 mg/100ml<br>88.00 mg/100ml<br>31.00 mg/100ml            |
| Kuhmilch<br>Entrahmte Milch<br>Muttermilch    | 0.06 mg/100ml<br>0.03 mg/100ml<br>0.23 mg/100ml                |
| Fleisch (Rind)<br>Eier                        | 0.50 mg/100g essbare Substanz<br>1.00 mg/100g essbare Substanz |
| Spinat<br>Kopfsalat                           | 2.50 mg/100g essbare Substanz<br>0.60 mg/100g essbare Substanz |

Tab.1:  $\alpha$ -Tocopherolgehalt verschiedener pflanzlicher und tierischer Nahrungsmittel [101,102].

### 1.1.2 Physikalisch-Chemische Eigenschaften

Tocopherole sind hellgelbe, visköse Öle. Sie sind unlöslich in Wasser, dagegen leicht löslich in polaren und unpolaren organischen Lösungsmitteln.

Tocopherole (Abb.2) bestehen aus einem Chromanring und einer apolaren Phytolseitenkette, welche dem Molekül seinen lipophilen Charakter verleiht.  $\alpha$ -Tocopherol, der wichtigste Vertreter der Tocopherole, besitzt ein Molekulargewicht von 430,72.

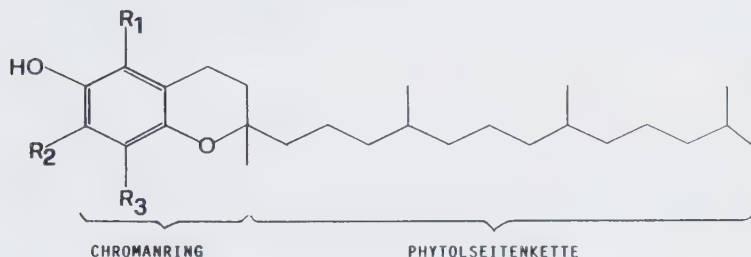


Abb.2: Chemische Strukturformel der Tocopherole.

$\alpha$ -Tocopherol:  $R_1=R_2=R_3=-CH_3$      $\beta$ -Tocopherol:  $R_1=R_3=-CH_3$      $R_2=H$

$\gamma$ -Tocopherol:  $R_2=R_3=-CH_3$      $R_1=H$      $\delta$ -Tocopherol:  $R_3=-CH_3$      $R_1=R_2=H$

Tocopherole sind als Monoäther eines Hydrochinons leicht oxidierbar und können dadurch mit Radikalen reagieren wie in Abbildung 3 gezeigt und in den folgenden Kapiteln weiter ausgeführt wird. Diese chemische Eigenschaft der Tocopherole ist für ihre antioxidative Wirkung verantwortlich. Sie werden dabei in einer 2-Elektronen-Radikalreaktion in verschiedene Produkte, wovon eines das abgebildete Tocopherylchinon darstellt, oxidiert (Abb.3).

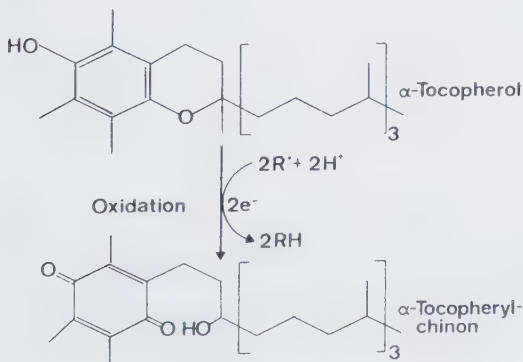


Abb.3: Radikalische Oxidation von  $\alpha$ -Tocopherol.

## Vit.E als Antioxidans

Antioxidantien werden in zwei Klassen unterteilt:

Primäre Antioxidantien hemmen die Auslösung von Radikalkettenreaktionen (siehe Lipidperoxidation, Abb.8), indem Radikale zu unschädlichen Produkten reduziert werden. Beispiel dafür ist die Reduktion von Sauerstoffradikalen durch Enzyme wie SOD, CAT, GPX und RPX (siehe auch Abbildung 9). Sekundäre oder kettenabbrechende Antioxidantien fangen kettenreaktion-propagandierende Radikale ab. Die meisten Vertreter dieser Gruppe gehören zu den Phenolen.

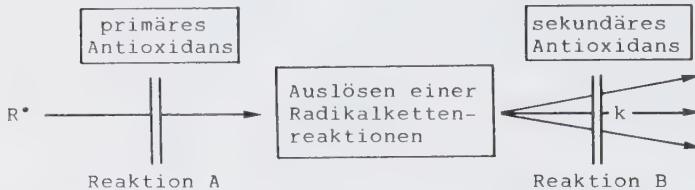


Abb.4: Wirkung von primären und sekundären Antioxidantien bei der Reduktion von Radikalen.

Tocopherole können wahrscheinlich sowohl als primäre als auch als sekundäre Antioxidantien wirken. Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  der radikalketten-abbrechenden Reaktion B wurde für die einzelnen Tocopherole in einer Arbeit von Burton [2] beschrieben (Tab.2).

|                      | $k$ [M <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> ] |
|----------------------|------------------------------------------|
| $\alpha$ -Tocopherol | $2.4 \times 10^6$                        |
| $\beta$ -Tocopherol  | $1.7 \times 10^6$                        |
| $\gamma$ -Tocopherol | $1.6 \times 10^6$                        |
| $\delta$ -Tocopherol | $6.5 \times 10^5$                        |

Tab.2: Geschwindigkeitskonstanten  $k$  der einzelnen Tocopherole in Reaktion B (Abb.4) bei 30°C bestimmt.

Die antioxidative Wirkung der Tocopherole wird durch den positiven induktiven Effekt der Methylsubstituenten des Phenolringes bestimmt. Zahl und Stellung der Methylgruppen stimmen mit den gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten überein.

Es konnte folgende Reihenfolge der antioxidativen Wirkung gemessen werden  $\alpha > \beta \gg \gamma > \delta$ , die gut mit den beobachteten biologischen Aktivitäten (Abb.1) übereinstimmt.

$\alpha$ -Tocopherol stellt also der häufigste als auch der antioxidativ und biologisch reaktivste Vertreter der Tocopherole dar. 90% der im menschlichen Körper transportierten Tocopherole sind  $\alpha$ -Tocopherol, die restlichen 10% sind  $\gamma$ -Tocopherol [8].

### 1.1.3 Funktion von Vit.E im Organismus

Als fettlösliches Antioxidans dient Vit.E dem Schutz lipophiler Strukturen vor oxidativer Schädigung. Die Untersuchung der Symptome von Vit.E-Mangelkrankheiten trug zur Aufklärung dessen physiologischer Wirkung bei.

#### Mangelsymptome bei Tieren

Bei Tieren führte Vit.E-Mangel zu unterschiedlichen Symptomen, die verschiedene Organsysteme betreffen: Muskeldystrophie, Störungen der Embryonalentwicklung und des Wachstums, Degeneration des Nervengewebes und der Fortpflanzungsorgane, hämolytische Anämie und erhöhte Oxidationsanfälligkeit des Körperfettes [3]. Obschon eine allgemeingültige pathophysiologische Wirkung bisher nicht gefunden wurde, scheint die vermehrte Lipid-Oxidation bei Vit.E-Mangel eine wichtige Ursache zu sein, die über Membranschädigung mehrere der genannten Symptome erklären kann.

#### Mangelsymptome beim Menschen

Vitamin E-Mangel-Krankheiten blieben bis 1976 unbekannt, bis Oski [4,5] eine hämolytische Anämie bei Frühgeborenen Kindern auf einen Vitamin-E-Mangel zurückführen und durch Substitution der Kinder mit Vit.E auch verhindern konnte. In der Folge ist der Mangel dieses fettlöslichen Vitamins bei schweren Fett-Malabsorptions-Krankheiten, wie beispielsweise bei cystischer Fibrose und chronischer, cholestatischer Lebererkrankung regelmässig gefunden worden. Da Vitamin E durch Lipoproteine im Plasma spezifisch transportiert wird, ist ein Mangel dieses Vitamins beim Fehlen der entsprechenden Lipoproteine zu erwarten. Bei der sehr seltenen A-Beta-Lipoproteinämie, von einem hereditären Fehlen des Apoproteins der Beta-Lipoproteine verursacht, ist erwartungsgemäss ein schwerer Vitamin-Mangel nachweisbar.

Bei den erwähnten, pädiatrischen Erkrankungen, die mit schwerem Tocopherolmangel verbunden sind, konnten dessen Symptome erfasst werden, die im folgenden zusammengefasst sind:

Neuro-muskuläre Symptome umfassen Funktionsstörungen peripherer Nerven (Areflexie und Ataxie), Sehstörungen und Muskelschwäche. Die hämatologischen Auswirkungen beschränken sich auf eine hämolytische Anämie mit charakteristischer Erythrocytenmorphologie (Acanthocyten).

Neben den Mangelercheinungen werden verschiedene pharmakologische Wirkungen des Vitamin E diskutiert. Zu diesen gehören die präventive Wirkung gegenüber Sauerstofftoxizität, die postuliert wurde, da Vitamin E in pharmakologischen Dosen Inzidenz und Schweregrad der Retinopathie [6] und möglicherweise der bronchopulmonalen Dysplasie [7] des Frühgeborenen vermindern konnte.

Die präventiven Wirkungen von Vitamin E auf die Entwicklung bestimmter Krebserkrankungen sowie von Herz-Kreislaufkrankheiten (insbesondere coronare Herzerkrankungen) sind noch sehr spekulativ.

Die gesicherten Wirkungen des Vitamin E lassen sich auf einen Schutz von Zellmembranen gegen oxidative Schädigung zurückführen (Neuro-, Myo- und Retinopathie, hämolyt. Anämie). Die hypothetische präventive Wirkung bei Malignomen basiert auf der Hypothese, dass in der Genese gewisser Tumoren chemische Radikalreaktionen involviert sind und der Tatsache, dass Tocopherol die Bildung derartiger Radikale (z.B. Nitrosamin-Abkömmlinge) wirksam verhindern kann.

## 1.2. Biochemie von Vitamin E

### 1.2.1. Aufnahme, Transport und Einbau in Zellmembranen

#### 1.2.1.1. Aufnahme und Transport

Tocopherole werden mit den Fettsäuren der Nahrung aus dem Dünndarm resorbiert, in Chylomikronen eingebaut und über die Lymphe dem Plasma zugeführt. Ein Teil des Tocopherols und der Triglyceride wird unter Mitwirkung der membranständigen Lipoproteinlipase (LPL) direkt an Fettgewebszellen abgegeben, der Rest wird von der Leber als Chylomikronen-Restpartikel aufgenommen. In der Leber werden Very low density Lipoproteine (VLDL) und High density Lipoproteine (HDL), die auch das resorbierte Tocopherol enthalten, synthetisiert und ans Plasma abgegeben. Im Plasma dienen somit VLDL, das davon durch Abspaltung von Triglyceriden entstandene Low density Lipoprotein (LDL) sowie HDL als Transportmoleküle für Tocopherol zu den Körperzellen (Abb.5).

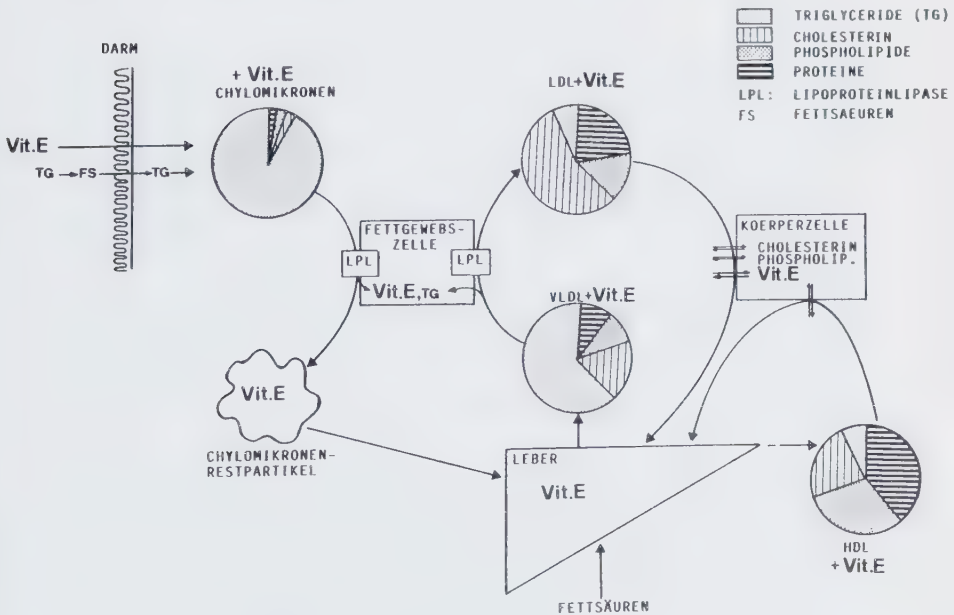


Abb.5: Aufnahme von Vit.E und dessen Transport zu den Körperzellen (Abb.modifiziert nach [104]).

Der Beitrag der einzelnen Plasma-Lipoproteine zum Vit.E-Transport kann aus dem Vit.E-Gehalt der einzelnen Lipoproteine abgeschätzt werden [9] (Tab.3).

| LIPOPROTEINE | VITAMIN E    |      | PROTEIN      |    | VIT.E/PROTEIN<br>µg/mg |
|--------------|--------------|------|--------------|----|------------------------|
|              | µg/ml Plasma | %    | mg/ml Plasma | %  |                        |
| VLDL         | 0.35 ± 0.08  | 5.5  | 0.07 ± 0.01  | 3  | 5.4 ± 1.0              |
| LDL          | 3.25 ± 0.26  | 50.5 | 0.76 ± 0.08  | 31 | 4.5 ± 0.4              |
| HDL          | 3.09 ± 0.50  | 44.0 | 1.64 ± 0.13  | 66 | 1.8 ± 0.2              |

Tab. 3: Vit.E- und Protein-Gehalt der einzelnen Lipoproteinen [9].

Die in Tabelle 3 gezeigten Werte beziehen sich auf Plasma, das nach 16-stündigem Fasten gewonnen wurde. Kurz nach Nahrungsaufnahme ist der Hauptteil des aufgenommenen Vit.E in Chylomikronen zu finden. Die Konzentration der Lipoproteine in menschlichem Plasma ist sehr variabel und beträgt 0.5-1.5 g/l für VLDL, 2.4-4.0 g/l für LDL und 2.5-5.0 g/l für HDL [10]. Obschon VLDL bezogen auf das Proteingewicht den höchsten Vit.E-Gehalt aufweist, wird im Nüchtern-Plasma der grösste Teil von Vit.E an LDL und HDL gebunden transportiert. Natives humanes Serumalbumin enthält kein Vit.E [11] und dient somit nicht als Vit.E-Transportmolekül, obschon es für andere lipophile Substanzen (Fettsäuren, Bilirubin, Hormone etc. [104]) eine wichtige Transportfunktion ausübt.

#### 1.2.1.2 Einlagerung in Zellmembran

Vit.E findet sich in allen biologischen Membranen [105]. Es existieren zwei mögliche Wechselwirkungen von Vit.E in Zellmembranen. Einerseits wurden Lipid-Lipid Interaktionen zwischen Vit.E und der Acyl-Seitenkette von Lipiden vorgeschlagen, andererseits konnten Bindungsstellen mit Proteinnatur für Vit.E isoliert werden, was auf eine Lipid-Protein Wechselwirkung hinweist. Beide Hypothesen sind in den nächsten beiden Abschnitten dargestellt.

## Vit.E-Lipid-Wechselwirkung

Vit.E bildet starke Komplexe mit Lipiden in Dipalmitoylphosphatidylcholinvesikeln, die durch Wasserstoffbrückenbildung zwischen der Hydroxylgruppe des Chromanringes von Vit.E und einem Sauerstoffatom der Phospholipide stabilisiert werden. Durch die Wasserstoffbrückenbildung steht das Hydroxylproton von Vit.E in einem dynamischen Gleichgewicht mit dem Phosphat-Sauerstoff, was zu einer erhöhten Reaktivität des Vit.E und damit zu einer Steigerung dessen antioxidativer Wirkung zum Schutz der benachbarten Lipide führt. Durch Röntgenstrukturanalyse wurde in Lipidbilayern ein Abstand von  $4.7 \text{ \AA}$  zwischen den Kohlenwasserstoffketten der Lipide gemessen, der durch rein hydrophobe Wechselwirkungen erklärt ist. Zwischen Lipiden und Vit.E verkürzte sich dieser Abstand auf  $3.6 \text{ \AA}$ , was auf stärkere Bindung durch die oben beschriebenen Wasserstoffbrückenbildung schliessen lässt [12].

Für die Komplexbildung von Vit.E mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren wurden in Aethanol Bindungskonstanten bestimmt [13]. Die Gleichgewichtskonstanten waren dabei für ungesättigte Fettsäuren wesentlich grösser als für gesättigte Fettsäuren und es wurde ein exponentieller Anstieg mit der Anzahl Doppelbindungen in Fettsäuremolekülen festgestellt. Diese Komplexbildung konnte sowohl in Liposomen als auch in natürlichen Membranen nachgewiesen werden. Der Befund, dass Vit.E in der inneren und äusseren Lipidschicht von Vesikeln gefunden wurde [14], lässt vermuten, dass Vit.E auch in Zellmembranen in beiden Schichten des Bilayers zu erwarten ist. Wie bei den Lipiden, ist in Vesikeln der polare Teil von Vit.E an der inneren und äusseren Membranoberfläche und der apolare Teil im Membraninnern angeordnet [14]. Eine schematische Darstellung der Vit.E-Lipid-Wechselwirkungen in Zellmembranen ist in Abbildung 6 gezeigt.

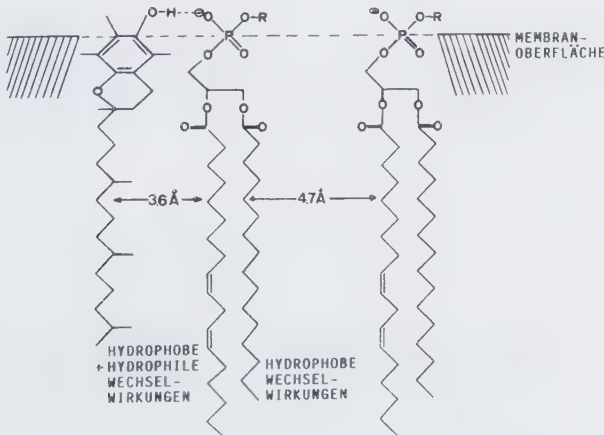


Abb.6: Modell der Vit.E-Lipid-Wechselwirkungen in Zellmembranen [12].

### Vit.E-Protein-Wechselwirkungen

Kitabchi et al. [15-18] beschrieb aufgrund von kinetischen Messungen das Vorhandensein von zwei spezifischen Bindungsstellen für Vit.E in menschlichen Erythrocyten-Membranen. Die eine wies eine hohe Affinität, aber niedrige Kapazität, die andere eine niedrige Affinität aber hohe Kapazität für Vit.E auf. Die gefundenen Gleichgewichtskonstanten ( $K_a$ ) und die Anzahl Bindungsstellen (BS) pro Zelle sind in Tabelle 4 dargestellt.

| $K_a$                          | BS/Zelle |
|--------------------------------|----------|
| $2.6 \times 10^{-7} \text{ M}$ | 7'600    |
| $1.2 \times 10^{-6} \text{ M}$ | 150'000  |

Tab.4: Vit.E-Bindungsstellen in Erythrocyten und Erythrocyten-Membranen [15-18].

Mit Tocopherol-Derivaten und Tocopherylchinon wurde keine Bindung beobachtet. Nur  $\gamma$ -Tocopherol wies eine im Vergleich zu  $\alpha$ -Tocopherol ungefähr 10%-ige Bindung auf. Vorbehandlung der EC-Membranen mit Trypsin verminderte die Fähigkeit, Vit.E zu binden, was die Proteinnatur der Bindungsstelle vermuten liess. Das postulierte Bindungsprotein konnte solubilisiert und eine Haupt- und Nebenkompente mit den Molekulargewichten von 65'000 bzw. 125'000 konnten isoliert werden. Es wurde eine Monomer-Dimer Beziehung zwischen diesen beiden Komponenten postuliert.

#### 1.2.1.3. Veränderung der Membraneigenschaften durch Vit.E-Einbau

Durch den Einbau von Vit.E in Zellmembranen wurden Veränderungen von verschiedenen Membraneigenschaften ausgelöst. Zahlreiche Studien an Phospholipidmodellmembranen bestätigten dies. Vielfältige Auswirkungen auf Membranpermeabilität und Fluidität wurden beschrieben und weisen auf eine strukturelle Rolle von Vit.E neben seiner antioxidativen Wirkung in der Zellmembran hin.

### Permeabilitätsveränderungen durch Vit.E

In zahlreichen Arbeiten wurden Permeabilitätsveränderungen durch Einbau von Vit.E in verschiedene Lipidvesikel und in Liposomen beschrieben. Es konnte für  $\text{Pr}^{3+}$  bei 33°C [19,20] und Na-Ascorbat bei 45°C [21] eine Steigerung, hingegen für D-Glukose und Chromat bei 30°C [22] und Harnstoff bei 25°C [23] eine Herabsetzung der Permeabilität festgestellt werden.

Eine Temperaturabhängigkeit des Einflusses von Vit.E auf die Permeabilität der Zellmembranen wurde diskutiert: Vit.E vermochte den osmotischen Transport unterhalb der Uebergangstemperatur (Gel-Flüssigkristallin) zu steigern, oberhalb war er jedoch vermindert [24,25].

### Veränderungen der Membranfluidität durch Vit.E

In Lipidbilayern konnte gezeigt werden [20,21,24-28], dass zunehmende Vit.E-Konzentrationen den Temperaturbereich des Phasenüberganges (Gel-Flüssigkristallin) verbreitern und die Anfangstemperatur des Phasenüberganges herabsetzen. Unterhalb der Uebergangstemperatur erhöhte Vit.E die Acyl-Ketten-Bewegung und damit die Lipidmobilität [19], oberhalb wurde jedoch eine verminderte Acyl-Ketten-Bewegung und damit eine Abnahme der Fluidität beobachtet [21,25,26]. Die Bilayer-Struktur von Vesikeln wurde jedoch durch Vit.E-Einbau nicht grundsätzlich verändert.

Der Einfluss von Vit.E auf verschiedene Lipidbilayer gleicht dem von Cholesterin. Erhöhte Acyl-Kettenordnung und verminderte Permeabilität in flüssigkristallinen Membranen wurden auch nach Einbau von Cholesterin beobachtet [29].

### 1.2.2. Funktion und Metabolismus von Vit.E

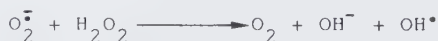
#### 1.2.2.1. Bildung und Wirkung toxischer Radikale

##### Exogene und endogene Radikale im menschlichen Körper

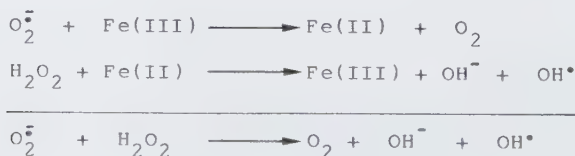
Es werden verschiedene Quellen von schädlichen Oxidantien, die entweder Radikale enthalten oder Radikalbildung in einem Zielmolekül bewirken können, unterschieden.

Exogene, also ausserhalb des Körpers gebildete Oxidantien wie NO, NO<sub>2</sub>, Russ, Teer, Tabakrauch, Ozon etc. werden von endogenen Oxidantien, die im Körper selbst gebildet werden, unterschieden. Letztere können als Nebenprodukte von Hydroxylierungs- bzw. Oxigenierungsreaktionen, der Atmungskette oder durch Autooxidationen entstehen. Es handelt sich dabei um partiell reduzierte Produkte des Sauerstoffs, wie zum Beispiele: Superoxidanionradikale (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), oder Hydroxylradikale (OH<sup>•</sup>).

Superoxidanionradikale und Wasserstoffperoxid sind viel weniger reaktiv als das aus der Reaktion dieser beiden Moleküle im Haber-Weiss-Prozess [30] erzeugte Hydroxylradikal. Hydroxylradikale werden als wichtigste Vertreter der partiell reduzierten Sauerstoffderivate für die Auslösung der meisten Folge-Reaktionen mit biologischen Molekülen verantwortlich gemacht.



Dieser Prozess ist in lebenden Zellen bei neutralem pH sehr langsam, kann aber durch Katalyse mit Metallionen wie Fe(II/III) erheblich gesteigert werden. Man spricht dann von einer eisenkatalysierten Haber-Weiss-Reaktion [106,107].



Durch Angriff dieser zum Teil hochreaktiven Radikale können irreversible Schäden an Molekülen hervorgerufen werden. Untersuchungen über die Art, das Ausmass und die Wirkung dieser oxidativen Schäden und über mögliche Schutzmechanismen im menschlichen Körper waren Ziel zahlreicher Forschungsarbeiten. Erythrocyten stellen eine leicht zugängliche Quelle menschlicher Zellen dar, weshalb sie in vielen Arbeiten Verwendung fanden. Daneben wurden Experimente an verschiedenen Modellsystemen durchgeführt, die eine Simulation oxidativer und antioxidativer Effekte der eventuell "in vivo" ablaufenden Prozesse, erlaubten.

In den folgenden Kapiteln werden die Beiträge zur Wirkung toxischer Radikale und antioxidativer Schutzmechanismen zusammengefasst.

### Radikalquellen für "in vitro" Experimente

Die beschriebene Haber-Weiss-Reaktion wurde "in vitro" zur Produktion von Radikalen verwendet. In verschiedenen Arbeiten [31,32,33,34] wurden damit EC-Membranen [31,34,35], Liposomen [32] oder Linoleat-Suspensionen [33] oxidativ belastet.

Wasserstoffperoxid wurde dabei entweder direkt zugegeben [35] oder enzymatisch durch die Reaktion von Xanthinoxidase (XOD) mit Xanthin [31,34] oder Acetaldehyd [32,33], die beide als Substrate der Xanthinoxidase dienen, erzeugt. Verschiedene Schwermetallionen wurden, zur Katalysierung der Haber-Weiss-Reaktion, zugefügt: Fe(III) [31,34,35], Fe(II) [35], Cu(II) [35]. Kellogg et al [32,33] fanden auch in Abwesenheit von Metallionen eine Radikal-Produktion, was auf eine nichtkatalysierte Haber-Weiss-Reaktion schliessen lässt.

Die Oxidation von Xanthin mit Xanthinoxidase (XOD-System) erlaubt die Produktion von Sauerstoffradikalen unter physiologischen Bedingungen (Verdünnte wässrige Lösung, pH 7.4) und ist in Abbildung 7 dargestellt.

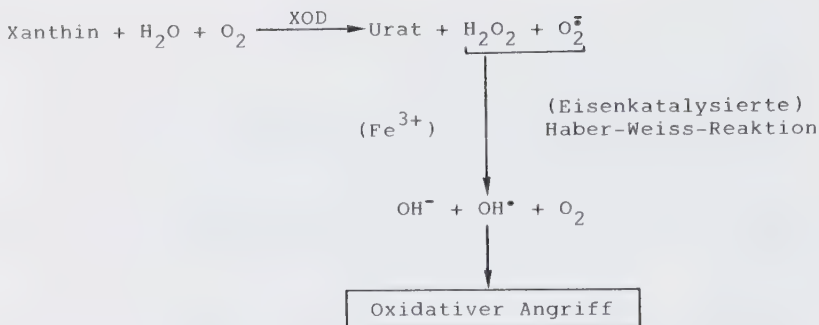


Abb.7: Enzymatische Bildung von Wasserstoffperoxid und Superoxidanionradikalen und deren Reaktion zu Hydroxylradikalen in der eisenkatalysierten Haber-Weiss-Reaktion.

Durch Angriff mit diesen "in vitro" produzierten Radikalen können verschiedene irreversible Schäden an Proteinen und Lipiden hervorgerufen werden, die im Folgenden dargestellt sind:

## Radikalinduzierte Veränderungen an Proteinen und Lipiden

### Lipidperoxidation

Ungefähr 60% der in EC-Membranphospholipiden enthaltenen Fettsäuren sind ungesättigt. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren dieser Lipide können durch Radikale peroxidiert werden (Abb.8) [36,37]. Radikale können an verschiedenen Stellen zwischen isolierten Doppelbindungen durch Entzug eines Elektrons die Reaktion starten. Die Produkte reagieren mit Sauerstoff zu neuen, radikalischen Verbindungen, die ihrerseits ungesättigte Fettsäuren angreifen und damit eine Kettenreaktion auslösen können. Daneben entstehen reaktive, nicht radikalische Produkte wie zum Beispiel Malondialdehyd (MAD), der durch Bildung Schiffischer Basen mit Aminogruppen von Proteinen [44,45] oder Phospholipiden zu deren Vernetzung führen kann.

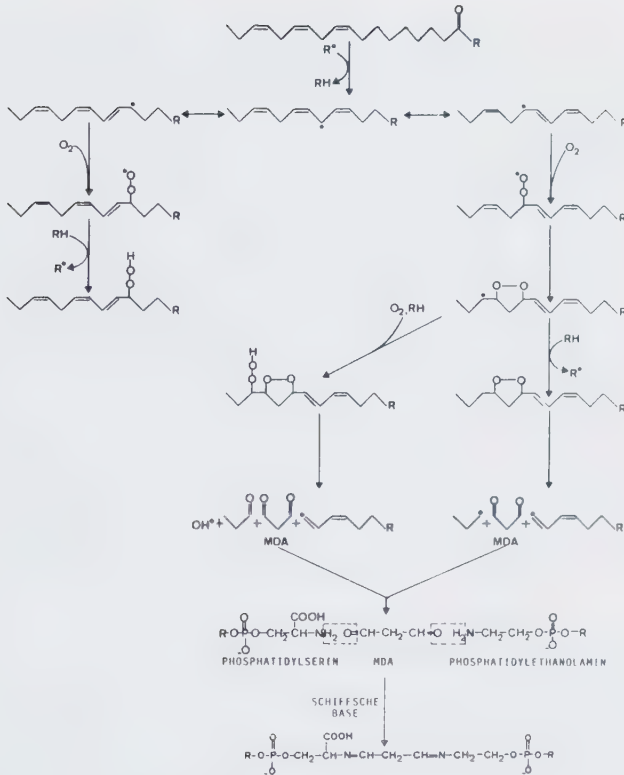


Abb.8: Lipidperoxidation [36,37]

Lipidperoxidationen wurden an EC-Membranen [31,34,35,38], Liposomen [32] und Linoleat-Suspensionen [33] untersucht. Zur Radikalproduktion wurde die Haber-Weiss-Reaktion benutzt, und die Lipidperoxidation wurde meistens [31,34,35,38] durch kolorimetrische Messung der MAD-Konzentration [39], und ausnahmsweise auch durch Dünnschichtchromatographie der extrahierten Lipide [32,33], bestimmt. Verschiedene Inhibitionsversuche [31,32,33,34] zeigten, dass sowohl Superoxiddismutase (Abbau der Superoxidanionradikale) als auch Katalase (Abbau von Wasserstoffperoxid) die Lipidperoxidation unterdrücken können, was zeigt, dass Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid gleichzeitig in der Reaktionslösung vorhanden sein müssen, um eine Lipidperoxidation auszulösen.

Inhibitionsversuche mit Hydroxylradikalfängern (Bsp. Mannitol) waren nicht eindeutig. In EC-Membranen konnte keine Hemmung der Lipidperoxidation beobachtet werden [31,34]. In mit Triton-X-100 solubilisierten Membranen wurde die Lipidperoxidation jedoch stark gehemmt [31].

Diese Befunde wurden wie folgt interpretiert: Hydroxylradikale sind sehr kurzlebig und reagieren deshalb nur mit ihren unmittelbaren Nachbarn, den solubilisierten Lipiden, aber nicht mit Lipiden der EC-Membranen. Die stabileren Superoxidanionradikale und Wasserstoffperoxidmoleküle können jedoch zur Membranoberfläche diffundieren und dort eventuell mit gebundenem Eisen Hydroxylradikale produzieren, die primär mit Membrankomponenten reagieren und nicht durch Radikalfänger neutralisiert werden können.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Superoxidanionradikale und Wasserstoffperoxid in der Reaktionslösung vorhanden sein müssen um eine Lipidperoxidation auszulösen, was darauf hinweist, dass Hydroxylradikale, im Haber-Weiss-Prozess produziert, involviert sind. Der genaue Reaktionsmechanismus ist noch unklar, es wird aber angenommen, dass Hydroxylradikale den direkten Reaktionspartner der ungesättigten Fettsäuren bei der Lipidperoxidation darstellen.

#### Oxidative Veränderungen an Proteinen

Sulfhydrylgruppen von Proteinen können durch den Angriff von Radikalen oxidiert werden und Disulfidbrücken bilden [13].

Spektrin ist dabei eines der auf oxidativen Angriff sensitivsten Membranproteine [40-43]. Radikalangriff auf EC [40], EC-Membranen [35,41,42] oder Inkubation von EC mit Malondialdehyd, einem Produkt der Lipidperoxidation [44,45], führte zur Abnahme der Spektrinlöslichkeit und zur Bildung von Proteinaggregaten, was durch SDS-Gel-Elektrophorese [41] nachgewiesen werden konnte.

Todo et al. [42] und Koster et al. [35] konnten in EC-Membranen zusätzlich zur Vernetzung, auch eine radiolytische Fragmentierung der Spektrinbanden in kürzere Polypeptide beobachten.

In vivo können die Auswirkungen oxidativer Belastungen anhand der Krankheit des Glukose-6-P-DH-Mangels [104] untersucht werden. Bei dieser Krankheit fehlt ein Schlüsselenzym des Hexosemonophosphat-Weges, welches die Hauptquelle antioxidativer Äquivalente (NADPH) in EC darstellt (Siehe Abb.10). Die Belastung von Glukose-6-P-DH-Mangel-EC mit oxidationsvermittelnden Substanzen (z.B. Sulfonamide) führt über eine Verminderung der Regeneration von GSH zur Disulfidbrückenbildung zwischen Membranproteinen einerseits und zwischen löslichen Proteinen und Membranelementen (Heinz'sche Innenkörper) andererseits.

### Auswirkungen auf Membran- und Zelleigenschaften

Vernetzungen von Membranproteinen [35,40,41,42,44,45] und Membranlipiden [46] führen in EC zu rheologischen Veränderungen. Erhöhte Rigidität [45,47] und herabgesetzte Filtrierbarkeit [40] und Fluidität [47] von EC-Membranen wurde beobachtet. Vernetzungen von Membrankomponenten konnten auch in älteren EC-Populationen [44,45] nachgewiesen werden und wurden als Ursache der EC-Membranalterung postuliert. Durch Einwirkung von Oxidantien konnte Met-Hämoglobin-Bildung [32,48] und Verminderung der Natrium-Kalium-ATPase Aktivität [40] in EC beobachtet werden. Zudem wurden Störungen der asymmetrischen Verteilung der Phospholipide in EC-Membranen [49,50] festgestellt. Es kam dabei zu einem Austausch von Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin von der inneren zur äusseren und von Phosphatidylcholin von der äusseren zur inneren Membranschicht.

Diese verschiedenen, durch oxidative Schädigungen hervorgerufenen Veränderungen können zu Hämolyse der EC [32,40,48,51] oder zu deren Phagozytose in der Milz, und damit zu einer Verkürzung der Lebensdauer führen.

#### 1.2.2.2 Schutz gegen toxische Radikale

Im menschlichen Körper wurden verschiedene Schutzmechanismen zum Abfangen toxischer Radikale gefunden. Enzymatische und nichtenzymatische antioxidative Reaktionen, die in den verschiedenen Kompartimenten des menschlichen Organismus wie Cytoplasma, Plasma und Membranen ablaufen, sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

#### Schutz im Cytoplasma

Toxische Radikale werden im Zellinnern durch Reduktion von molekularem Sauerstoff gebildet und setzen sich hauptsächlich aus Superoxidationradikalen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen zusammen. Im Cytoplasma finden sich Enzyme, um diese Radikale unschädlich zu machen (Abb.9).

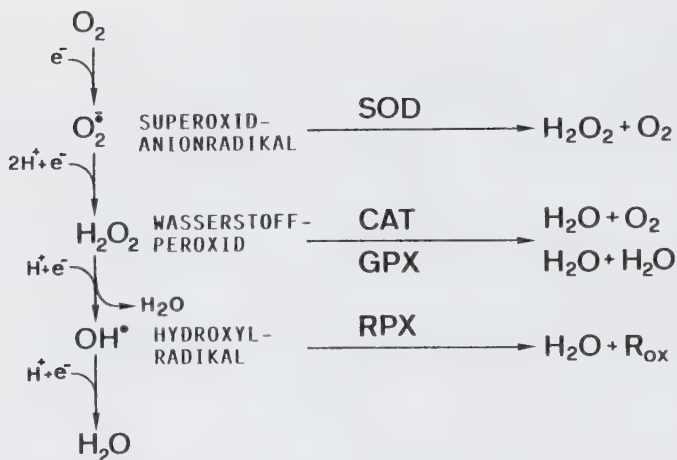


Abb.9: Enzymatischer Abbau der, durch Reduktion von molekularem Sauerstoff entstandenen Radikale im Cytoplasma. (SOD=Superoxiddismutase, CAT=Katalase, GPX=Glutathionperoxidase, RPX=Verschiedene Peroxidasen)

Die Konzentration von Superoxidanionradikalen wird durch katalytische Disproportionierung durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) [52] reguliert. Die Anreicherung von Wasserstoffperoxid wird durch zwei Enzyme, der peroxisomalen Katalase (CAT) und der cytoplasmatischen Glutathionperoxidase (GPX), verhindert. GPX enthält an der aktiven Stelle zum Elektronentransport ein Selen [53] und ist eine unspezifische Peroxidase, die neben Wasserstoffperoxid auch Lipidhydroperoxide abbauen kann und gleichzeitig reduziertes Glutathion oxidiert (Abb.10).



Abb.10: Abbau von Wasserstoffperoxid durch GPX im EC. (GPX=Glutathionperoxidase, GSSG-R=Glutathion-Reduktase, G6PDH=Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, G6P=Glukose-6-Phosphat, 6PG=6-Phosphogluconat)

Zusätzlich können die Sulfhydrylgruppen von reduziertem Glutathion (GSH) durch Reaktion mit verschiedenen Radikalen zu Disulfidbrücken oxidiert werden und so eine antioxidative Schutzfunktion ausüben. Hydroxylradikale werden durch verschiedene Peroxidasen (RPX) abgefangen und zu Wasser reduziert.

Das Zellinnere weist also ein sehr gut ausgebildetes enzymatisches Abwehrsystem auf, das zusammen mit GSH die empfindlichen Strukturen des Cytoplasmas wirksam vor oxidativen Schäden bewahren kann.

### Schutz im Plasma und in der Erythrocytenmembran

Plasma und EC-Membranen besitzen verschiedene, durch die hydrophile oder lipophile Umgebung geprägte, antioxidative Systeme, die eine Schutzfunktion ausüben können.

Im Plasma wurden vor allem wasserlöslichen Antioxidantien wie Vitamin C, GSH und Urat, aber auch lipoproteingebundenem Vit.E [55-58] und verschiedenen Proteinen eine antioxidative Wirkung zugeschrieben.

In EC-Membranen nimmt man dagegen an, dass Vit.E allein die antioxidative Schutzfunktion ausübt.

Der Beitrag der einzelnen Komponenten zum Oxidationsschutz im Plasma und der EC-Membranen wurde durch Messung der antioxidativen Kapazität bestimmt.

### Messung der antioxidativen Kapazität

Experimentell können Radikale kontinuierlich und mit konstanter Reaktionsgeschwindigkeit erzeugt werden. Diese Radikale können durch Sauerstoff in Abwesenheit von Antioxidantien peroxidiert werden. Durch Vergleich der Peroxylradikalproduktion, mit und ohne Zusatz des zu untersuchenden Mediums, kann die antioxidative Kapazität des Mediums bestimmt werden. Sie wird ausgedrückt als die molare Konzentration der durch das Antioxidans vernichteten Radikale [59].

Die antioxidative Kapazität wurde in Plasma und in EC-Membranen in verschiedenen Arbeiten von Burton et al. [55-58] bestimmt.

In menschlichem Plasma wurde eine antioxidative Kapazität von 0.95 mM gefunden, diese wurde auf Vit.E (6%), Urat (26%) und Vit.C (1%) zurückgeführt. Die verbleibenden 67% wurden durch Oxidation der Hydroxyl- und Sulfhydrylgruppen der Aminosäureseitenketten von Serumproteinen und Lipoproteinen und von Glutathion erklärt [56].

Die Messung der antioxidativen Kapazität in EC wurde an extrahierten Lipiden durchgeführt und stellt somit kein zuverlässiges Mass der gesamten antioxidativen Kapazität der EC-Membran dar [57,58]. Es konnte aber gezeigt werden, dass in der Zellmembran Vit.E das einzige fettlösliche Antioxidans darstellt. Es wird daher angenommen, dass es sich bei Vit.E um das hauptsächlichste Antioxidans der Zellmembran handelt.

## Kooperation zwischen Antioxidantien in Modellsystemen

In verschiedenen Arbeiten wurde eine gewisse Kooperativität zwischen Vit.E und anderen Antioxidantien wie Vit.C und GSH postuliert.

Diese Wechselwirkungen beruhen auf der bereits beschriebenen 2-Elektronen Oxidation von Vit.E, bei der nach dem ersten Oxidationsschritt ein metastabiles Chromanoxylradikal gebildet wird [60]. Die Lebensdauer dieses Radikals ist durch Delokalisation des radikalischen Elektrons stark erhöht (ca.  $10^4$ , [75]), so dass eine Reaktion des Chromanoxylradikals mit verschiedenen Reduktionsmitteln möglich ist. Experimentell wurde gezeigt, dass dieses Radikal mit Vit.C [61,62], Glutathion [62,63] und Cystein [63] reagieren kann. Die daraus resultierenden Modellvorstellungen der Zusammenarbeit von Vit.E mit Vit.C und reduziertem Glutathion sind in den nächsten beiden Abschnitten zusammengestellt.

### Interaktion von Vit.E mit Vit.C

Inhibition der Peroxidation von Lipiden durch Kombination von Vit.E und Vit.C wurde in verschiedenen Arbeiten beschrieben [60-62,64-67]. Vit.E und Vit.C können synergistisch als sekundäre, also kettenabbrechende Antioxidantien, wirken. Packer et al. [61] zeigte, dass Chromanoxylradikale (Vit.E $^{\bullet}$ ) durch Vit.C reduziert und damit Vit.E regeneriert werden kann.

In organischer Lösung wurde gezeigt [65], dass Vit.E die Lipidperoxidation viel stärker hemmt als Vit.C. Die antioxidativen Effekte von Vit.E und Vit.C sind additiv, Vit.C wird jedoch zuerst vollständig oxidiert bevor eine Vit.E-Abnahme gemessen werden konnte, was zu der in Abbildung 11 dargestellten Reaktionshypothese führte.

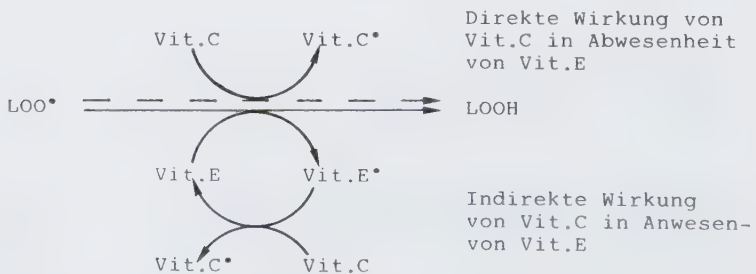


Abb.11: Reaktionsmechanismus der Kooperation von Vit.E und Vit.C bei der Neutralisation von Lipidperoxid-Radikalen (LOO $^{\bullet}$ ) in organischer Lösung.

Aehnliche Resultate wurden in wässriger Suspension von in Phosphatidylcholinliposomen eingebautem Vit.E erhalten [68,69]. Durch Messung der Radikal-Konzentrationen mit EPR (Elektron Paramagnetic Resonance) [69] konnte gezeigt werden, dass Vit.C-Radikale primär gebildet wurden und Chromanoxylradikale erst kurz vor dem vollständigen Verbrauch von Vit.C nachweisbar wurden.

Ein anderer Reaktionsmechanismus muss vermutet werden, wenn die Radikale im Lipid-Kompartiment der Liposomen gebildet werden [68]. Im Gegensatz zur Oxidation mit wasserlöslichen Radikalbildnern nahm die Vit.E-Konzentration allmählich und gleichzeitig mit Vit.C, das in der wässrigen Phase vorlag, ab. Die im Lipidkompartiment der Liposomen gebildeten Chromanoxylradikale (Vit.E<sup>•</sup>) können nur zum Teil durch Vit.C zu Vit.E regeneriert werden, der andere Teil reagiert mit weiteren Lipidperoxid-Radikalen zu Vit.E-Oxidationsprodukten (Abb.12).

Diese Befunde belegen die Vermutung, dass Radikale in der wässrigen Phase bevorzugt von Vit.C, in der lipophilen Phase jedoch bevorzugt durch Vit.E neutralisiert werden.

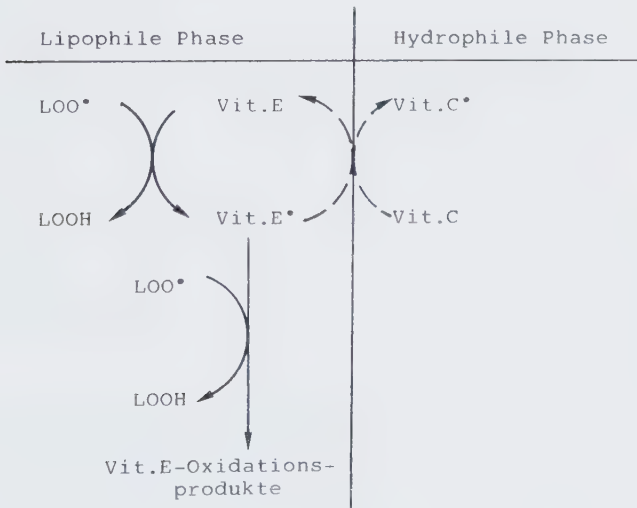


Abb.12: Reaktionsmechanismus der Kooperation von Vit.E und Vit.C bei der Neutralisation von Lipidperoxid-Radikalen gebildet im Lipid-Kompartiment der Liposomen.

## Interaktion von Vit.E mit Glutathion

Eine ähnliche synergistische Inhibition der Oxidation von Vit.E durch reduziertes Glutathion wurde postuliert [62,63,70,71]. Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass auch hier eine teilweise Regenerierung von Vit.E stattfinden kann.



Abb.13: Reaktionsmechanismus der Kooperation von Vit.E und GSH bei der Neutralisation von Lipidperoxid-Radikalen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Radikale, die in biologischen Systemen gebildet werden, in der lipophilen Phase durch Vit.E und in der wässrigen Phase durch Antioxidantien wie Vit.C, GSH, Urat oder Cystein bevorzugt abgefangen werden. Eine teilweise Regenerierung von Vit.E durch Vit.C und eventuell GSH wurde in vitro beschrieben, gleichzeitig wurde jedoch eine Oxidation von Vit.E zu verschiedenen Oxidationsprodukten beobachtet.

### 1.2.2.3. Antioxidative Wirkung von Vit.E in der Zellmembran

#### Reaktion mit Radikalen

Die beschriebene Orientierung von Vit.E in Zellmembranen (Abb.6) lässt zwei Mechanismen für dessen antioxidative Wirkung postulieren [72].

#### 1.Reaktion an der Membranoberfläche:

Der Chromanring, aufgrund seiner Polarität an der Membranoberfläche liegend, kann mit seiner reaktiven Hydroxylgruppe Radikale, die ausserhalb des Bilayers, in der wässrigen Phase gebildet werden direkt abfangen.

#### 2.Reaktion innerhalb der Membran:

Der beschriebene Mechanismus bietet keine Erklärung für die antioxidative Wirkung, welche Vit.E auf Radikale, die innerhalb der Lipidmembran gebildet werden, ausübt. Eine mögliche Erklärung dieser Funktion von Vit.E wurde in einer Arbeit von Ivanov [72] aufgrund von energetischen Überlegungen und experimentellen Daten dargestellt (Abb.14)

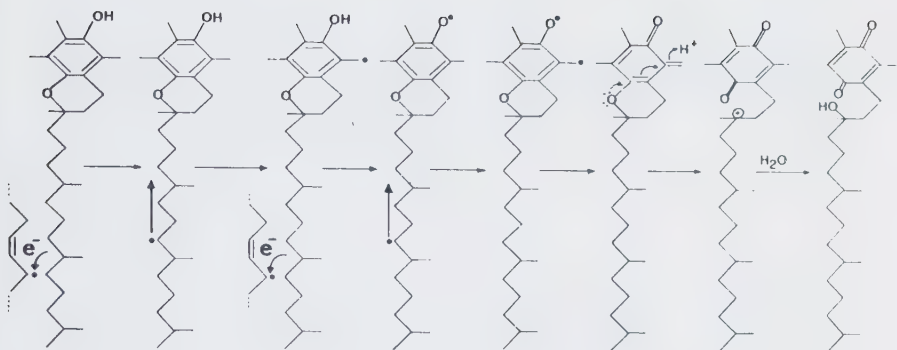


Abb.14: Oxidation von Vit.E durch Transport von Elektronen entlang der Phytolseitenkette.

Die enge Nachbarschaft der Lipid- und Vit.E-Seitenkette erlaubt den einfachen Uebergang radikalischer Elektronen von Vit.E zum Lipidradikal (Abb.14). Es wird postuliert [72], dass das auf dem Vit.E-Molekül neu entstandene radikalische Zentrum durch die unpolare Umgebung im Membraninnern entlang der Phytolseitenkette zum Chromanring wandern kann, bevor eine Reaktion mit Sauerstoff stattfinden kann. Die Entfernung von zwei Elektronen aus dem Chromanring führt zur Bildung von Oxidationsprodukten wie hier zum Beispiel Tocopherylchinon.

### Bildung von Oxidationsprodukten

Durch Radikalangriff auf Vit.E und Vit.E-Modellverbindungen (ohne Phytolseitenkette) konnten in organischer Lösung verschiedene Oxidationsprodukte hergestellt, isoliert und charakterisiert werden. Verschiedene Arbeiten [73-75] zeigten, dass der erste Schritt dieser Reaktion immer eine 1-Elektronen-Radikalreaktion darstellt, die zur Bildung des relativ stabilen Chromanoxylradikals führt (Abb.15).

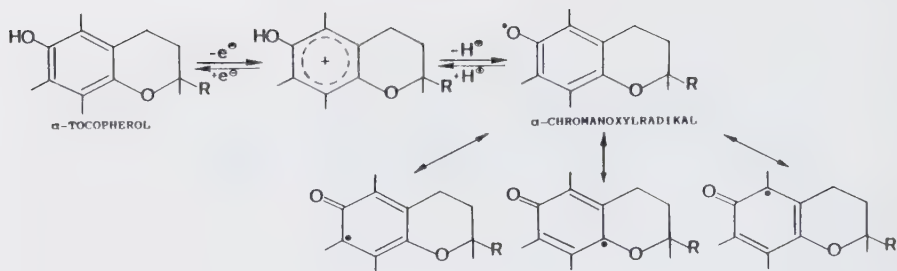


Abb.15: 1-Elektronen-Oxidation von Vit.E zum Chromanoxylradikal.

Das Chromanoxylradikal besitzt in organischer Lösung eine Halbwertszeit von ca. 10 Minuten [75] und geht durch Abgabe eines weiteren Elektrons in Oxidationsprodukte über. Abbildung 16 stellt eine Zusammenfassung der Hauptoxidationsprodukte von Vit.E dar.

Die dargestellten 2-Elektronen-Oxidationsprodukte von Vit.E wurden in organischer Lösung hergestellt. Einige dieser Produkte, wie Tocopherylchinon [76-78], 9-Hydroxy-Tocopheron [74,77] und Chinonmethid [74] konnten auch durch Oxidation in neutralem wässrigen Milieu produziert werden. In vivo konnte durch Verabreichung von markiertem Vit.E an Ratten Tocopherylchinon als einziges der oben beschriebenen Oxidationsprodukte nachgewiesen werden [80,90].

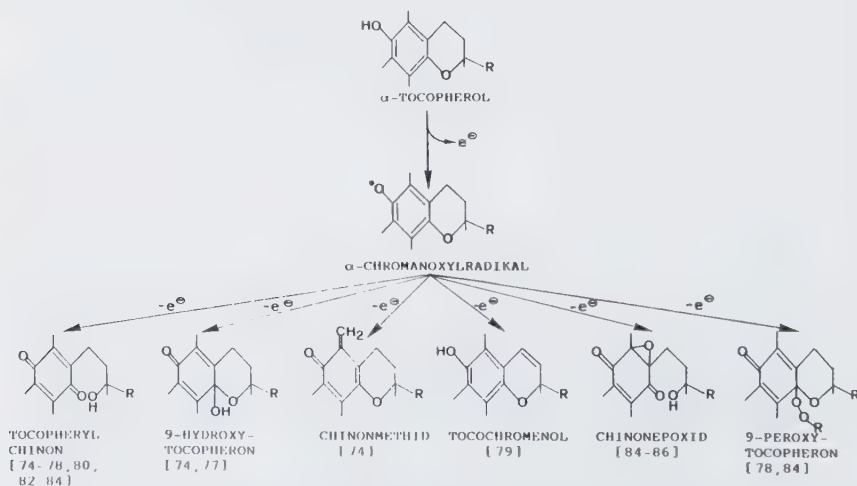


Abb.16: Bildung von verschiedenen Vit.E-Oxidationsprodukten in einer 2-Elektronen-Radikalreaktion.

### 1.2.3.Exkretion

Nach Verabreichung von grossen Mengen  $\alpha$ -Tocopherol an Kaninchen oder Menschen konnten aus dem Urin zwei wasserlösliche Stoffwechselprodukte der Tocopherole isoliert werden [87,88]. Dabei handelt es sich um  $\alpha$ -Tocopheronsäure und  $\alpha$ -Tocopheronolacton, die nach ihrem Entdecker auch als Simonmetabolite bezeichnet werden (Abb.17).

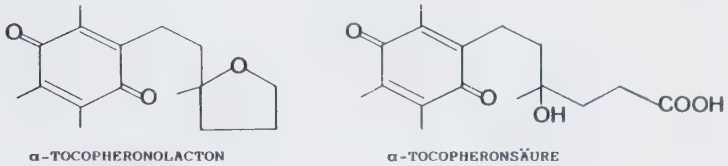


Abb.17: Aus Urin isolierte, wasserlösliche Stoffwechselprodukte von Vit.E (Simonmetabolite).

Untersuchungen an Ratten mit markiertem Vit.E führten zur folgenden Vorstellung der Vit.E-Ausscheidung [89] (Abb.18).

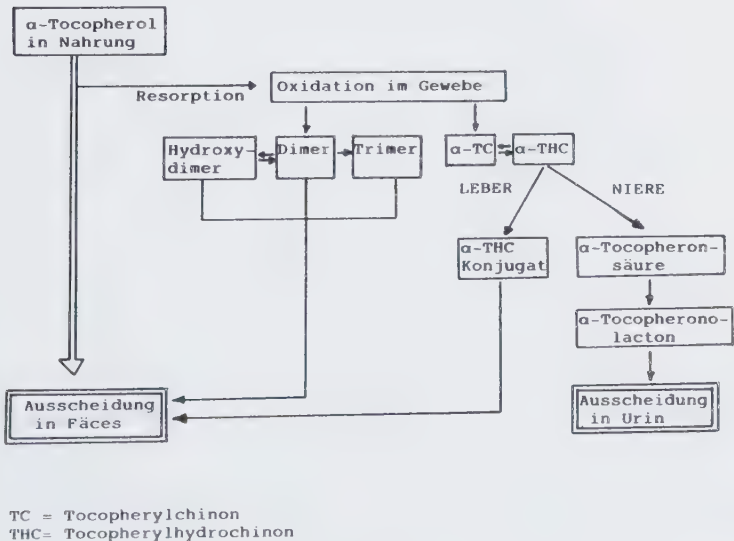


Abb.18: Ausscheidung von wasserlöslichen und fettlöslichen Vit.E-Oxidationsprodukten.

Ein grosser Teil des Vit.E wird im Darm nicht resorbiert, sondern wieder mit den Fäzes ausgeschieden. Das aufgenommene Vit.E wird im Gewebe oxidiert und entweder über Tocopherylchinon und den daraus gebildeten Simon-Metaboliten im Urin, oder durch Konjugation zu Dimeren und Trimeren mit den Fäzes ausgeschieden. Keines der in Abbildung 18 dargestellten Oxidationsprodukte konnte im Gewebe in mehr als Spurenkonzentrationen nachgewiesen werden.

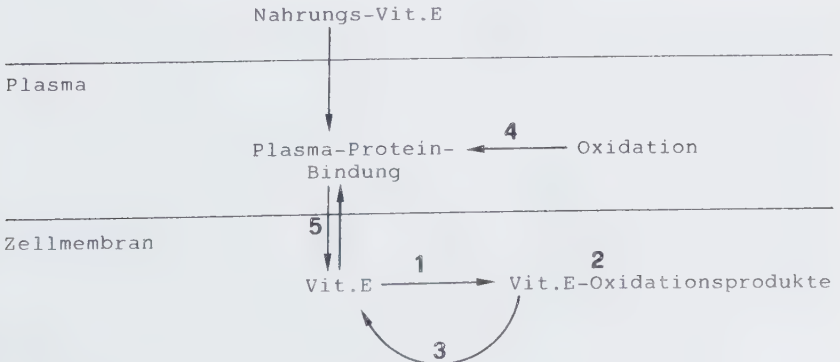
### 1.3. Fragestellung

Vit.E ist sehr leicht oxidierbar und kann dadurch eine antioxidative Funktion ausüben [Abb.3]. Als stark hydrophobes Molekül ist Vit.E zur antioxidativen Wirkung in lipophilen Strukturen geeignet. In Lösung konnten verschiedene Oxidationsprodukte gebildet, isoliert und charakterisiert [Abb.16] werden.

Verschiedene Arbeiten beschäftigten sich mit Resorption und Verteilung von Vit.E im Organismus. Sehr wenig ist jedoch über die Oxidation von Vit.E während seines Transportes im Plasma und seinem Zielorganell - der Zellmembran - bekannt.

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Transport von Vit.E im Plasma, dessen Aufnahme in EC und dessen Oxidation in biologischer Umgebung. Die einzelnen Fragestellungen können wie folgt zusammengefasst werden.

1. Kann Vit.E in EC-Membranen oxidiert werden? (Suche nach einem geeigneten Oxidationssystem, um Vit.E unter physiologischen Bedingungen zu oxidieren.)
2. Vergleich der Vit.E-Oxidation in EC-Membranen mit dessen Oxidation in definierten Modellsystemen.  
Charakterisierung und eventuell Identifizierung der gebildeten Oxidationsprodukte.
3. Sind Vit.E-Oxidationsprodukte in EC-Membranen stabil oder können sie zu Vit.E zurück reduziert werden?
4. Kann Vit.E während seines Transportes im Plasma oxidiert werden?
5. Welchen Beitrag leisten die einzelnen Lipoproteine zur Vit.E-Uebertragung auf EC?



## 2. METHODEN

=====

### 2.1. Chemikalien und Lösungen

#### Chemikalien

##### Enzyme:

- Xanthin-Oxidase (XOD): EC 1.2.3.2., Kristallsuspension in Ammoniumsulfat 1U/mg (Böhringer Mannheim). Die Enzymsuspension wurde vor Gebrauch in die entsprechende Pufferlösung überführt.
- Aldehyd-Dehydrogenase (ADH): EC 1.2.1.5., lyophilisiert, 15U/mg (Böhringer Mannheim)
- Katalase: EC 1.11.1.6., in Glycerin, 65'000U/mg (Böhringer Mannheim)

##### Proteine:

- Humanes Serumalbumin (HSA): Kristallisiert, lyophilisiert, hergestellt nach Cohn, E. et al. J. Am. Chem. Soc.: 69, 1753 (1974) von Sigma
- Bovines Serumalbumin (BSA): Fraktion V (Sigma)

##### Weitere Chemikalien:

- Xanthin (Merck)
- NADP: Na<sub>2</sub>-Salz (Böhringer Mannheim)
- 5,5'-Dithio-bis-(2-nitro-benzoesäure) (DTNB): Kristallisiert (Böhringer Mannheim)
- Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (Merck)
- Vitamin E: DL- $\alpha$ -Tocopherol, pharm. 31IE/mg (Serva)
- <sup>3</sup>H-Vitamin E: DL- $\alpha$ -Tocopherol-3,4-<sup>3</sup>H: 340 uCi/mg in Toluol (Geschenk der Firma Hoffmann-La Roche)
- DL- $\alpha$ -Tocopherylchinon: ICN Nutritional Biochemicals, Cleveland

Die anderen im Handel erhältlichen Chemikalien wurden in p.A. Reinheit eingesetzt.

#### Lösungen

NaCl-Tris-Puffer: 147mM NaCl, 5mM Tris-HCl, pH 7.4

PBS-Puffer: 137 mM NaCl, 3mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4

Na-P-Puffer: 78 mM NaCl, 2.5 mM Tris-HCl, 94 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4

## 2.2. EC- und Plasmagewinnung aus humanem Vollblut

Frisches humanes Vollblut, antikoaguliert mit Heparin 15 I.E./ml, wurde 5 Min. bei 1500g zentrifugiert. Das Plasma wurde separiert und die gepackten EC wurden drei Mal mit NaCl-Tris-Puffer gewaschen. Die leukocytenreiche Schicht wurde durch Absaugen von der Oberfläche entfernt.

## 2.3. Extraktion von Lipiden aus Plasma und Erythrocyten

Es wurde eine von Rieser [91] modifizierte Methode [92,93] angewandt.

### 2.3.1. Extraktion aus Plasma

In 100  $\mu$ l Plasma wurden die Proteine durch Zugabe von 100  $\mu$ l Aethanol präzipitiert. Anschliessend wurden die Lipide mit 500  $\mu$ l Hexan und 5-minütigem Schütteln (Vortex) bei RT unter Verschluss extrahiert. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation konnte ein 400  $\mu$ l Aliquot der organischen Phase gewonnen und durch Vakuum-Konzentration (Speed-Vac) bei 45°C eingetrocknet werden.

### 2.3.2. Extraktion aus Erythrocyten

250  $\mu$ l gepackte EC wurden mit 20  $\mu$ l einer 4%-igen Triton X-100 Lösung in Wasser lysiert. 750  $\mu$ l einer 2.5%-igen Vitamin C-Lösung in Wasser wurde als Oxidationsschutz addiert und die Proteine mit 1000  $\mu$ l Aethanol präzipitiert. Die Proben wurden mit 1500  $\mu$ l Hexan versetzt und gut gemischt (Gel-Bildung). Nach 15 Minuten (RT, dunkel) wurde die organische Phase durch Zentrifugation abgetrennt, ein 1000  $\mu$ l-Aliquot gewonnen und dieses durch Vakuum-Zentrifugation (Speed-Vac) zur Trockenheit eingedampft (45°C).

### 2.3.3. Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) von Vit.E, isoliert aus Plasma und Erythrocyten

Die eingedampften Lipid-Extrakte aus Plasma oder EC wurden sofort weiterverarbeitet.

Nach Auflösen in 150  $\mu$ l 2-Propanol wurde ein 100  $\mu$ l Aliquot nach der in Tab. 5A gezeigten HPLC-Analysenmethode aufgetrennt.

**Tabelle 5 :** HPLC-Systeme zur Darstellung von Vitamin E und seinen, unter verschiedenen Bedingungen hergestellten, Oxidationsprodukten.

| Anwendung                                                                                        | Feste Phase                          | Mobile Phase                            | Detektionswellenlänge |   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|---|
| Darstellung von Plasma-und EC-Vit.E<br>Abschnitt:2.3.3.                                          | Lichrosorb RP-18, 10µm<br>0.5 x 25cm | 100% Methanol<br>Fluss:2ml/min          | 292 nm                | A |
| Oxidation mit FeCl <sub>3</sub><br>Darstellung von Vit.E und seinen Ox.Prod.<br>Abschnitt:2.4.1. | Lichrosorb RP-18, 10µm<br>0.5 x 25cm | 100% Methanol<br>Fluss:2ml/min          | 280 nm                | B |
| Oxidation mit CuSO <sub>4</sub><br>Darstellung von Vit.E und seinen Ox.Prod.<br>Abschnitt:2.4.2. | Lichrosorb RP-18, 10µm<br>0.5 x 25cm | 100% Methanol<br>Fluss:2ml/min          | 280 nm                | C |
|                                                                                                  |                                      | 100% 2-Propanol<br>Fluss:2ml/min        | 280 nm                | D |
| Oxidation mit XOD-System<br>Darstellung von Vit.E und seinen Ox.Prod.<br>Abschnitt:2.5.3.1.      | Lichrosorb RP-18, 10µm<br>0.5 x 25cm | 6% Wasser in Methanol<br>Fluss:2ml/min  | 292 nm                | E |
| Quantitative Trennung der Ox.Prod.<br>Abschnitt:2.5.3.2.                                         |                                      | 15% Wasser in Methanol<br>Fluss:2ml/min | 260 nm                | F |
| Semipräparative Trennung der Ox.Prod.<br>Abschnitt:2.5.3.2.                                      |                                      | 15% Wasser in Methanol<br>Fluss:6ml/min | 260 nm                | G |

Druck: < 200 bar

Detektionssystem:-Durchflussszelle (1cm, 8µl)  
 -UV-Absorption Uvikon 730 S LC (Kontron)  
 -Daten Auswertung: Automatische Peak-Integration durch HP-Integrator (HP 3390A).  
 -Empfindlichkeit: 0.00026 Absorptions-Einheiten /cm (mit Integrator HP 3390A).

Vit.E hatte in diesem HPLC-System eine Retentionszeit von 7.8-8.3 Minuten. Die Vit.E-Konzentration wurde durch Interpolation auf einer, unter identischen experimentellen Bedingungen hergestellten, externen Eichkurve ermittelt.

Im Plasma wurde die Vit.E-Konzentration in  $\mu\text{Mol}$  pro Liter Plasma ausgedrückt.

In EC wurde sie auf einen Liter gepackte Zellen bezogen. Die dazu benötigte Hb-Konzentration der Proben wurde spektroskopisch bestimmt. Die, durch HPLC gemessenen Vit.E-Konzentrationen wurden durch die Hb-Konzentration der entsprechenden Proben dividiert und mit der Normal-Hb-Konzentration von gepackten EC von 20.8 mMol/l [10] multipliziert.

#### 2.3.4. Isolierung von Vit.E-Oxidationsprodukten aus Plasma und Erythrocyten

Die Oxidationsprodukte wurden mit der gleichen Methode wie das Plasma- bzw. EC-Vit.E extrahiert. Da sie sich jedoch zum Teil als sauerstoffempfindlich erwiesen, mussten die Hexanüberstände unter Stickstoff eingengt und aufbewahrt werden. Die unterschiedlichen HPLC-Bedingungen zur Darstellung der Oxidationsprodukte werden in Abschnitt 2.5.3. besprochen und sind in Tabelle 5B-G zusammengestellt.

### 2.4. Oxidation von Vit.E mit Metallsalzen

#### 2.4.1. Oxidation mit $\text{FeCl}_3$

Zu 100  $\mu\text{l}$  einer 10mM Vit.E-Lösung in Aethanol wurde 100  $\mu\text{l}$  einer 20 mM  $\text{FeCl}_3$ -Lösung in 50% Aethanol / Wasser addiert und eine Stunde bei RT geschüttelt. Danach wurden 100  $\mu\text{l}$  Wasser und 1000  $\mu\text{l}$  Hexan zugegeben und weitere 10 Min. geschüttelt. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation wurde ein 500  $\mu\text{l}$  Aliquot Hexanextrakt entnommen, wie bereits beschrieben (2.3.1.) aufgearbeitet und in 1000  $\mu\text{l}$  2-Propanol aufgelöst. 10  $\mu\text{l}$  davon wurden nach den in Tabelle 5B gezeigten Bedingungen analysiert.

Die Retentionszeiten für Vit.E und dessen Oxidationsprodukt Tocopherylchinon betrugen 8 bzw. 6 Min. Die gewählte Wellenlänge von 280 nm stellt einen Kompromiss zur gleichzeitigen Identifikation von Vit.E ( $\lambda_{\text{max}} = 292 \text{ nm}$ ) und Tocopherylchinon ( $\lambda_{\text{max}} = 268 \text{ nm}$ ) dar (siehe Abschnitt 3.5.3.3.).

## 2.4.2. Oxidation mit CuSO<sub>4</sub>

### 2.4.2.1. Oxidation mit CuSO<sub>4</sub> in Wasser/Alkohol

Zu 20 µl einer 100 mM CuSO<sub>4</sub>-Lösung in Wasser wurde 70 µl Wasser und 10 µl einer 250 µM <sup>3</sup>H-Vit.E-Lösung in Aethanol addiert. Die Proben wurden 3 Stunden bei 37°C inkubiert, mit 500 µl Hexan extrahiert und wie in Abschnitt 2.3.1. beschrieben aufgearbeitet. Nach Auflösen in 150 µl 2-Propanol wurde ein 100 µl-Aliquot auf HPLC gemäss Tabelle 5C,D analysiert.

### 2.4.2.2. Oxidation mit CuSO<sub>4</sub> in Deoxycholat

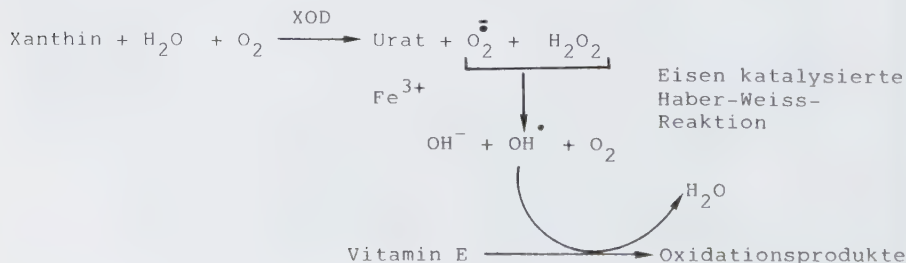
2.5 nMol Vit.E in alkoholischer Lösung wurden in einem Glasgefäss unter Stickstoff zur Trockenheit eingengt und mit 80 µl einer 0.2%-igen Lösung von DOC in PBS-Puffer, in wässrige Lösung überführt. Die Oxidation erfolgte mit 20 µl einer 100 mM CuSO<sub>4</sub>-Lösung in Wasser während 3 Stunden bei 37°C. Die Proben wurden anschliessend, wie in Abschnitt 2.4.2.1. beschrieben, weiterverarbeitet und auf HPLC gemäss Tabelle 5D analysiert.

Zur Aufnahme der Absorptionsspektren wurde je 1 µMol Vit.E in alkoholischer Lösung in einem Glasgefäss unter Stickstoff zur Trockenheit eingengt und mit 800 µl einer 0.2%-igen Lösung von DOC in PBS-Puffer solubilisiert. Die Oxidation erfolgte mit 200 µl einer 100 mM CuSO<sub>4</sub>-Lösung in Wasser während 3 Stunden bei 37°C. Proben wurden vor und nach der Oxidation mit 2 ml Hexan extrahiert. Die Hexanextrakte der Edukte und Produkte wurden durch Zentrifugation abgetrennt und spektroskopisch untersucht.

## 2.5. Oxidation unter physiologischen Bedingungen

### 2.5.1. Oxidation mit dem XOD-System

Die Oxidation von Vit. E unter physiologischen Bedingungen wurde mit einem enzymatischen, radikalgenerierenden System [34] durchgeführt.

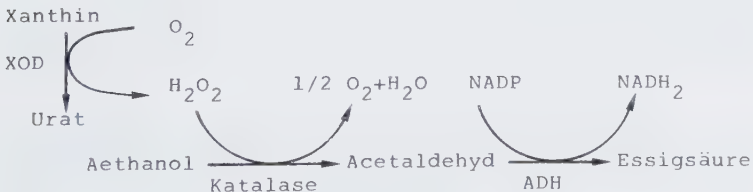


Bis zu  $0.2 \mu\text{Mol}$  Vit.E, gelöst in Aethanol, wurde unter Stickstoff zur Trockenheit eingengt und anschliessend mit 1 ml des gewünschten Milieus ( $0.2\%$  DOC oder Serumalbumin oder Lipoproteine in physiologischem Puffer, pH 7.4), wie in Abschnitt 2.7.2. beschrieben in Lösung gebracht. EC wurden mit einem HK von ca. 40, und EC-Membranen (Abschnitt 2.6.) in einer Verdünnung von 1 mg/ml oxidiert.

Zu 1 ml der Vit.E-Lösung bzw.EC oder Membran-Suspension wurden  $20 \mu\text{l}$  einer 100 mM Xanthinlösung in  $0.15 \text{ N KOH}$ ,  $20 \mu\text{l}$  einer 10 mM  $\text{FeCl}_3$ -Lösung in Wasser und  $1.2 \mu\text{l}$  ( $0.025 \text{ U}$ ) Xanthinoxidase (XOD) in physiologischem Puffer addiert. Die Oxidationsgemische wurden 4 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Bei Experimenten mit Vit.E solubilisiert in DOC oder gebunden an Plasmaproteine wurden die Reaktionsedukte und Produkte gemäss 2.3.1. extrahiert. In Experimenten mit Vit.E in EC und isolierten EC-Membranen wurde Vit.E und seine Oxidationsprodukte nach Waschen der EC (3x, analog zu 2.2.) und EC-Membranen (3x analog zu 2.6.1., jedoch mit physiologischem Puffer anstelle des Tris-Puffers, Resuspension in physiologischem Puffer: ca. 1mg Membranprotein/ml) gemäss 2.3.2. extrahiert. Die eingeeengten Hexanextrakte wurden in  $150 \mu\text{l}$  2-Propanol aufgenommen und  $100 \mu\text{l}$  davon nach den in Tabelle 5E-G zusammengestellten HPLC-Analysenmethoden untersucht. Die Vit.E-Konzentration der EC-Membranen wurde pro g Membranprotein ausgedrückt.

### 2.5.2. Xanthin-Bestimmung

Die Xanthinkonzentration im XOD-System wurde enzymatisch bestimmt [94].



Es wurden jeweils  $0.02 \text{ ml}$  des XOD-Oxidationsgemisches in 1 ml einer Lösung von  $1.2 \text{ M}$  Aethanol;  $1.2 \text{ mM}$  NADP;  $130 \text{ U/ml}$  Katalase und  $0.8 \text{ U/ml}$  Aldehyd-Dehydrogenase in Na-Pyrophosphat/Kaliumchlorid-Puffer ( $50\text{mM}/50\text{mM}$ ) pH 8.0 gebracht. Die ursprüngliche Xanthin-Konzentration wurde aus der Extinktionszunahme bei  $340 \text{ nm}$  ( $\epsilon_{\text{NADPH-NADP}} = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Endpunkt) berechnet.

### 2.5.3. HPLC-Bedingungen zur Trennung von Vit.E und seinen Oxidationsprodukten, hergestellt mit dem XOD-System.

#### 2.5.3.1. Gleichzeitige Darstellung von Vit.E und seinen Oxidationsprodukten.

Zur gleichzeitigen Darstellung von Vit.E und seinen Oxidationsprodukten wurde 6% Wasser in Methanol als Elutionsmittel gewählt (Tabelle 5E). Die Oxidationsprodukte wurden dabei nicht vollständig separiert (als Bsp. siehe Abb.19), dafür konnte die Eduktabnahme und die Produktzunahme verfolgt werden. Zur genauen Messung von Vit.E-Konzentrationen wurde als Detektions-Wellenlänge 292 nm gewählt, für die gleichzeitige Messung von Vit.E und seinen Oxidationsprodukten musste eine tiefere Wellenlänge (260 nm) angewandt werden. Vitamin E besitzt in diesem System eine Retentionszeit von 26-27 Minuten. Die gebildeten Oxidationsprodukte werden alle mit einer kürzeren Retentionszeit eluiert.

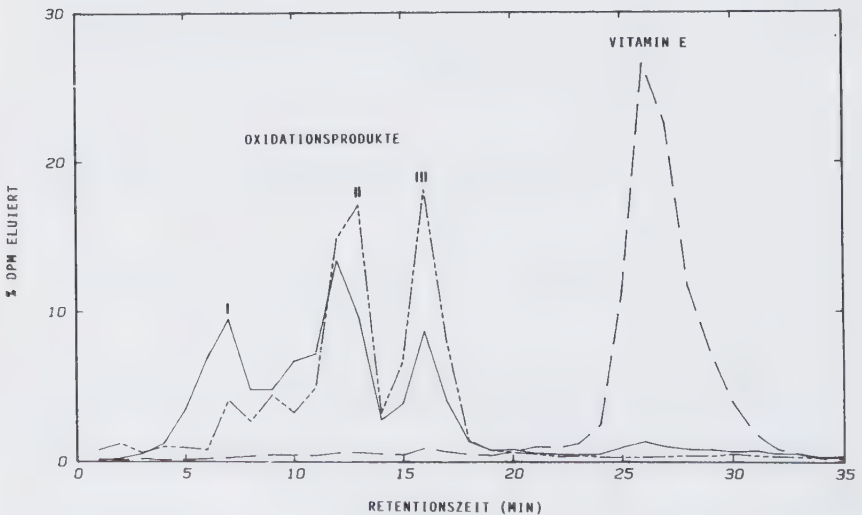


Abb.19: HPLC-Analyse von Vit.E und seinen mit dem XOD-System hergestellten Oxidationsprodukte mit 6% Wasser in Methanol als Elutionsmittel. HPLC-Elutionsprofile vor (—) und nach der Oxidation von in DOC solubilisiertem Vit.E (---) oder in EC-Membranen inkorporiertem Vit.E (····).

### 2.5.3.2. Darstellung der Oxidationsprodukte

Zur Optimierung der Trennung der einzelnen Oxidationsprodukte wurden verschieden polare Elutionsmittel überprüft. Die Retentionszeiten der drei Hauptoxidationsprodukte und von Vitamin E in Abhängigkeit der Polarität des Elutionsmittels sind in Abbildung 20 dargestellt.

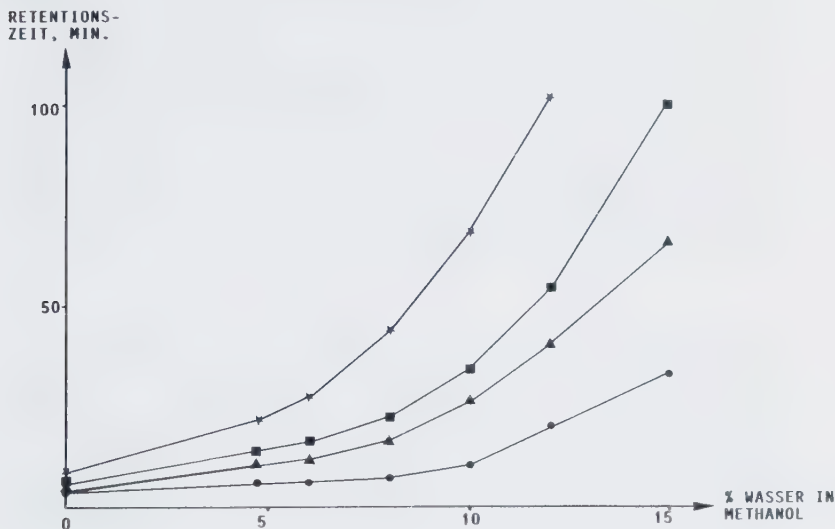


Abb. 20: Abhängigkeit der Retentionszeiten von Vit.E(★—★) und seinen Oxidationsprodukten I(●—●), II(▲—▲), III(■—■) von der Polarität des Elutionsmittels. HPLC-Bedingungen: Siehe Tabelle 5E,F.

Als Elutionsmittel zur Trennung der Oxidationsprodukte wurde im Folgenden bei allen Experimenten 15% Wasser in Methanol gewählt. Die typischen Retentionszeiten der Hauptoxidationsprodukte liegen zwischen 30 und 110 Minuten. Bei diesen Bedingungen wird Vit.E nicht mehr eluiert und muss mit 100% Methanol von der Säule gespült werden. Zur quantitativen Bestimmung der Oxidationsprodukte wurde eine Li-chrosorb-Säule der Dimension 0.5x25 cm, zur semipräparativen Darstellung der Produkte hingegen eine Säule 2.0x25cm verwendet (siehe Tabelle 5G).

## 2.6. Erythrocyten-Membranen

### 2.6.1. Isolierung von Erythrocyten-Membranen

Die EC-Membranen wurden nach einer Methode von Sheetz [113] präpariert. Dazu wurden EC drei Mal mit 147 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4 gewaschen. Anschliessend wurden sie mit dem 10-fachen Volumen einer eiskalten 10 mM Tris-Lösung, pH 7.4 während 30 Minuten lysiert. Das Lysat wurde 10 Min. bei 27'000g und 4°C zentrifugiert. Der Ueberstand wurde abgesaugt, das freifliessende Sediment gewonnen und das feste Sediment verworfen. Die so gewonnenen EC-Membranen wurden mit 10 mM Tris, pH 7.4 (4°C) so oft gewaschen (ca.5x), bis sie weiss, d.h. frei von sichtbaren Hb-Verunreinigungen (Rötung) waren. Anschliessend wurden die EC-Membranen durch Suspension in isotoner Lösung (NaCl-Tris-Puffer) verschlossen (resealed Ghosts) und für weitere Versuche sofort verwendet. Die Konzentration der Membranproteine wurde nach Lowry (Abschnitt 2.8.) bestimmt.

### 2.6.2. Herstellung von $^3\text{H}$ -Vit.E markierten EC-Membranen

Ca. 80  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Vit.E in Aethanol wurde unter Stickstoff eingedampft. 5ml einer 4%-igen Lösung von humanem Serumalbumin in NaCl-Tris-Puffer wurde zugegeben, mehrmals mit Ultraschall homogenisiert und 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Elimination des nicht albumingebundenen Vit.E wurde die Serumalbuminlösung in ein frisches Glasgefäss transferiert und über Nacht bei 4°C leicht geschüttelt. Dabei wurde freies Vit.E von der Glasoberfläche adsorbiert. Die Vit.E-Albumin-Lösung wurde mit 5ml gewaschenen und gepackten EC (HK ca.40) gemischt und 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurden die EC durch Zentrifugation gewonnen und zu EC-Membranen (siehe 2.6.1) weiterverarbeitet. Die Ausbeute der Markierung betrug ca. 40 %.

## 2.7. Lipoproteine

### 2.7.1. Isolierung und Reinigung von Lipoproteinen aus menschlichem Plasma.

Die Lipoproteinisolierung wurde mit einer leicht modifizierten Methode nach Behrens [9] durchgeführt.

Humanes Vollblut wurde nach 16-stündigem Fasten gewonnen mit EDTA (2mg/ml) antikoaguliert, und sofort weiterverarbeitet.

Nach Abtrennen der zellulären Bestandteile durch Zentrifugation (10 Min., 2000g) wurde das Plasma durch Zugabe von KBr auf eine Dichte von 1.225 g/l gebracht, 6.5 ml wurden mit 6.5 ml KBr-Lösung gleicher Dichte in einem 13.5 ml Zentrifugenröhrchen überschichtet und 24 Stunden bei 150'000g (15°C) ultrazentrifugiert. Die Lipoproteine wurden als stark gelben Ueberstand gewonnen und sofort weiterverarbeitet.

Die aus der Ultrazentrifugation gewonnenen Lipoproteine wurden auf eine Biogel A 15 m Säule appliziert und gemäss Abbildung 21 durch Gelfiltration getrennt.

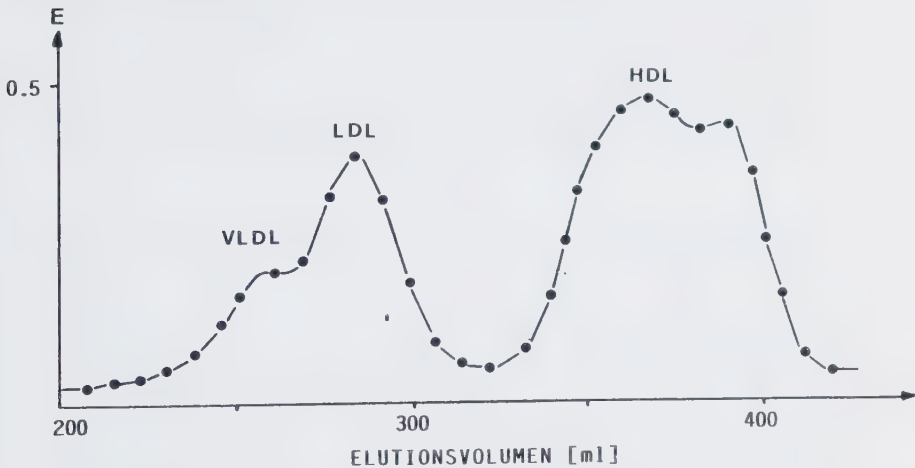


Abb. 21: Elutionsprofil der Lipoprotein-Gelfiltration. Säule: Biogel A 15m (200-400 Mesh), Dimension: 2.5 id x 92cm Elution: 0.2 M Natriumphosphat, 0.1M NaCl, 0.01 % EDTA Puffer, pH 7.4 Auftragvolumen: 0.15 ml/ml Gelbett.

Die Fraktionen wurden entsprechend der Absorption bei 278 nm vereinigt und deren Reinheitsgrad mittels Lipoprotein-elektrophorese [100] überprüft. Die vereinigten Lipoproteinfraktionen wurden durch Dialyse gegen 94 mM Natriumphosphat, 78 mM NaCl, 2.5 mM Tris Puffer, pH 7.4 umgepuffert und durch Vakuum-Dialyse aufkonzentriert.

Nach Sterilfiltration durch 0.45 µm-Filter konnten die Lipoproteine während mehrerer Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

Die LP-Konzentrationen in den gereinigten Fraktionen wurden durch Messung deren Proteinkonzentration (2.8.) bestimmt. Mit Hilfe des bekannten Proteingehaltes der LP [10] konnte die LP-Konzentration errechnet werden.

### 2.7.2. Bindung von Vit.E an Serumalbumin und Lipoproteine

Vit.E oder  $^3\text{H}$ -Vit.E wurde in der gewünschten Menge in einem Glasgefäß unter Stickstoff zur Trockenheit eingeeengt. Die Serumalbuminlösung (0.6mM) oder Lipoproteinlösung (vergleichbare Konzentration wie im menschlichen Plasma, siehe Tab.6) in physiologischem Puffer wurde zugegeben und 4 Stunden bei 37°C geschüttelt. In Serumalbumin-Lösungen konnte durch Ultraschall-Behandlung die Proteinbindung des Vit.E beschleunigt werden. Lipoprotein-Lösungen erwiesen sich als zu empfindlich für diese Behandlung. Zur Elimination des nichtgebundenen Vit.E wurden die Serumalbumin- und Lipoproteinlösungen in frische Glasgefäße transferiert und über Nacht bei 4°C leicht geschüttelt. Dabei wurde freies Vit.E von der Glasoberfläche adsorbiert. Die Ausbeute der Vit.E-Bindung variierte zwischen Serumalbumin und den einzelnen Lipoproteinen. Human Serumalbumin (HSA) konnte durchschnittlich 44%, High density lipoprotein (HDL) 83%, Very low density lipoprotein (VLDL) 22% und Low density lipoprotein (LDL) 16% des eingesetzten Vit.E binden.

### 2.8. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Lowry [95] bestimmt.

Zu 0.5 ml einer Probe mit 20-200  $\mu\text{g}$  Protein / ml wurden 5 ml einer Lösung von 0.18 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.8 mM  $\text{CuSO}_4$ , 0.4 mM Na/K-Tartrat Lösung in 0.1 N NaOH zugegeben. Nach 20 Minuten (RT) wurde 0.5 ml 50%-iges Folin-Phenol-Reagens in Wasser addiert und nach 30 Minuten die Extinktion bei 650 nm gegen einen Null-Wert mit 0.5 ml Puffer anstelle der proteinhaltigen Probe gemessen. Eine Eichkurve, die mit einer BSA-Lösung (1mg/ml) aufgenommen wurde, erlaubte die Berechnung der Proteinkonzentration.

### 2.9. Sulfhydrylgruppentitration

Die Sulfhydryl(SH)gruppen-Titration wurde nach der Methode von Ellman [96] durchgeführt.

Die SH-Gruppentitration erfolgte in (2x0.475cm)Tandemküvetten mit einer 1mM DTNB (5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) in PBS-Puffer, pH 7.4. Beide Küvetten enthielten in der einen Kammer 800  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer und in der anderen 800  $\mu\text{l}$  einer 100  $\mu\text{M}$  Serumalbuminlösung in PBS-Puffer. In der Referenzküvette wurde das DTNB zum Puffer, in der Probenküvette hingegen zur Proteinlösung addiert. Titriert wurde in 50  $\mu\text{l}$  Schritten mit der 1mM DTNB-Lösung bis zum Endpunkt und die Extinktionszunahme wurde bei 412 nm gemessen. Zur Berechnung der Konzentration der SH-Gruppen wurde der Extinktionskoeffizient für das gebildete TNB (5-Thio-2-nitrobenzoesäure) von 13.6  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  verwendet.

## 2.10. SDS (Nariumdodecylidisulfat) / Polyacrylamid Gelelektrophorese

### Lösungen

#### Probenpuffer:

100 mM Tris-HCl, pH 6.8; 20 % Glycerin (V/V); 2 % SDS (G/V); 4 mM EDTA, mit Bromphenolblau als Frontindikator

#### 3-%iges Gel:

0.42 M Acrylamid, 5 mM N,N'-Methylenbisacrylamid, 1.5 mM Amoniumpersulfat, 0.07% N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) (V/V) in 0.4 M Tris-HCl pH 8.8, 0.09% SDS (G/V) und 3.3% Glycerin (V/V)

#### 15-%iges Gel:

2.1 M Acrylamid, 25 mM N,N'-Methylenbisacrylamid, 1.5 mM Amoniumpersulfat, 0.07 % TEMED (V/V) in 0.4 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS (G/V) und 10% Glycerin (V/V)

#### 3-%iges Obergel:

0.42 M Acrylamid, 5 mM N,N'-Methylenbisacrylamid, 1.8 mM Amoniumpersulfat, 0.16% TEMED (V/V) in 0.13 M Tris-HCl pH 6.8 und 0.1% SDS (G/V)

#### Reservoir-Puffer:

0.025 M Tris-HCl pH 8.6, 0.15 M Glycin und 0.1% SDS (G/V)

### Ausführung

Proben von EC-Membranen wurden vor und nach der Oxidation mit dem XOD-System untersucht: Nach dreimaligem Waschen mit NaCl-Tris-Puffer wurden die Proben 1:2 mit Probenpuffer verdünnt. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurde zum Probenpuffer zum Teil 0.28 M Mercaptoethanol addiert. Nach Inkubation bei 37°C während 30 Minuten wurde ein Aliquot dieser Proben von ca. 30-80 µg Protein entnommen und elektrophoretisch getrennt.

Gelpolymerisation und Elektrophorese wurden nach Fairbanks [97], Lämmli [98] und Maurer [99] durchgeführt. Es wurde ein kontinuierliches Gradientensystem von 3-15% Acrylamid verwendet. Dazu wurde ein 3-%iges Gel kontinuierlich zu einem 15-%igen Gel beigelegt und zu einer vertikalen Gelplatte (15x10x0.15cm) gegossen. Anschliessend wurde das Gradienten-Gel mit einem 3-%igen Obergel überschichtet in welches die Proben-Aussparungen eingearbeitet wurden. Nach 1-stündiger Polymerisation wurden die Proben (50 µl) aufgetragen und während 2-3 Stunden mit 30-50 mA elektrophoretisch getrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau R-250 2.5% (G/V) in 80% Methanol angefärbt, mit einer Lösung von 7% Eisessig in 10%-igem Methanol entfärbt und anschliessend fotografiert.

## 2.11. Spektroskopische Messungen

### 2.11.1. Absorptionsspektroskopie

UV- und VIS-Spektren in Abbildung 30 wurden mit einem Uvikon 810 Zweistrahl-Spektrophotometer bei RT in Quarzküvetten einer Schichtdicke von 1 cm und einer spektralen Bandbreite von 2 nm aufgenommen. Die Messung erfolgte in Aethanol oder Hexan mit dem Lösungsmittel als Referenz.

Die in Abbildung 49 dargestellten Spektren wurden mit HP 8451A Diode-Array Spektrophotometer bei RT in Quarzküvetten einer Schichtdicke von 1 cm und einer spektralen Bandbreite von 2 nm aufgenommen. Die Messungen erfolgten in Aethanol, die Lösungsmittelspektren wurden subtrahiert.

### 2.11.2. Kernresonanzspektroskopie

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden mit einem Bruker AM 400 Gerät bei 400 MHz aufgenommen. Die Proben wurden dazu im Hochvakuum getrocknet in Chloroform gelöst und bei Raumtemperatur gemessen.

### 2.11.3. Infrarot-Spektroskopie

Infrarotspektren wurden mit einem Perkin-Elmer 257 Messgerät aufgenommen. Die Proben wurden dazu im Hochvakuum getrocknet, in Chloroform gelöst und mit einer NaCl-Zelle mit 0.2 cm Schichtdicke gemessen.

### 2.11.4. Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden mit einem Finnigan 3200 Quadrupol Massenspektrometer im eI-Betrieb (Electron impact) mit Direkt-Einlass (ca.50 ng Probe) bei 60 eV aufgenommen. (Messbereich: 50-650 Dalton, Auflösung: 1600 Dalton)

### 3. ERGEBNISSE

=====

#### 3.1. Löslichkeit von Vit.E

Die Löslichkeit des hydrophoben Vitamin E in physiologischen, wässrigen Systemen wurde untersucht. Dazu wurde Vitamin E, gelöst in Aethanol oder Toluol, unter Stickstoff vom organischen Lösungsmittel befreit und als Lipidfilm an eine Glasoberfläche gebunden. Tabelle 6 zeigt die Desorptionsfähigkeit verschiedener wässriger Medien.

| Medium           | Verteilung<br>Medium/Glas |
|------------------|---------------------------|
| NaCl-Tris-Puffer | 0.04                      |
| DOC (4.8mM)      | 9.0                       |
| HSA (0.6mM)      | 1.04                      |
| VLDL(1.5g/l)     | 0.22                      |
| LDL (3.0g/l)     | 0.14                      |
| HDL (6.1g/l)     | 1.38                      |

Tab.6: Desorption von glasgebundenem Vit.E durch verschiedene wässrige Medien:

2-5  $\mu\text{M}$  radioaktives Vit.E wurde während 4 Stunden bei 37° mit dem entsprechenden System (DOC, HSA, VLDL, LDL und HDL in NaCl-Tris-Puffer) inkubiert. Die Verteilung wurde aus dem Verhältnis von in Medium gelöstem, zu dem an der Glasoberfläche verbleibenden Vit.E berechnet.

In Abbilung 22 wird die Sättigung von SA mit Vit.E gezeigt. Dabei wurde glasadsorbiertes Vit.E mit verschiedenen SA-Mengen gelöst. Ein Vergleich von bovinem und humanem SA zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die mit äquimolaren Vit.E- und SA-Konzentrationen erreichte Sättigung von 50% entspricht einer Vit.E-Beladung von 0.5 nmol/nmol SA.

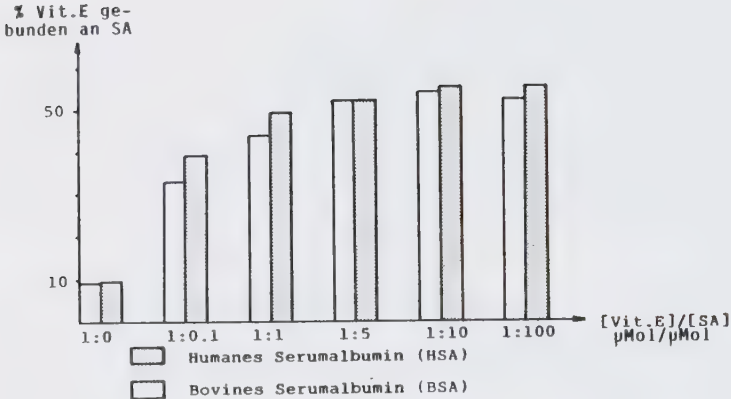


Abb.22: Sättigung von SA mit Vit.E:

Je  $1.2 \text{ nMol } ^3\text{H-Vit.E}$  in Aethanol wurde unter Stickstoff eingedampft und mit je  $1 \text{ ml SA}$  in NaCl-Tris-Puffer der Konzentration  $0; 0.12; 1.2; 6; 12$  und  $120 \mu\text{M}$  während 4 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Proben, die vor der Inkubation zusätzlich mit Ultraschall ( $2 \times 1 \text{ Min.}$ ) gemischt wurden, zeigten nach 4 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  keine Unterschiede in der gebundenen Vit.E-Menge. Die Radioaktivität der Proteinlösungen wurde bestimmt und in Prozent der ursprünglich eingesetzten Vit.E-Menge ausgedrückt.

Tabelle 6 und Abbildung 22 zeigen, dass eine geringe Vit.E-Menge auch in reinen wässrigen Systemen in freier Lösung vorliegt. Für die Interpretation von Experimenten ist die Elimination von nicht-proteingebundenem und somit freiem Vit.E von grosser Wichtigkeit. Abbildung 23 zeigt die Adsorption von freiem Vit.E, gelöst in verschiedenen Medien, an eine Glasoberfläche.

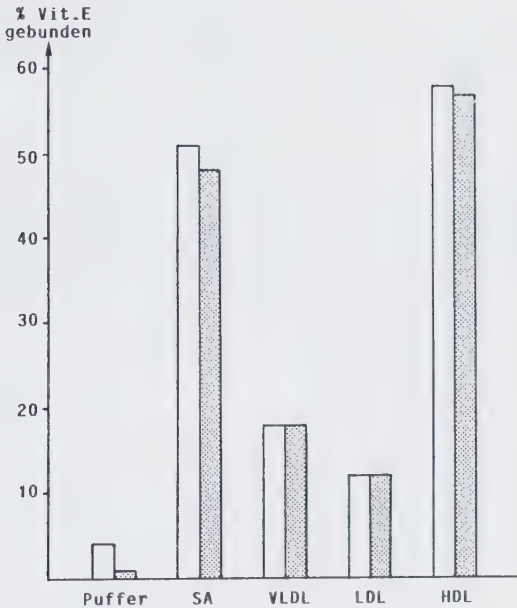


Abb.23 Readsorption von Vit.E aus verschiedenen Medien an Glasoberfläche:

- ☐ % Vit.E gelöst oder suspendiert (4h, 37°C)
- ☐ % Vit.E in Lösung oder Suspension verbleibend (über Nacht, 4°C)

Die gleichen, wie in Tab.6 beschriebenen, experimentellen Bedingungen wurden verwendet. Die Proben wurden jedoch nach der 4-stündigen Inkubation bei 37°C in ein neues Glasgefäß transferiert und über Nacht bei 4°C leicht geschüttelt.

Abbildung 23 zeigt, dass noch 20% des in Puffer solubilierten Vit.E nach der Inkubation bei 4°C in Lösung nachgewiesen werden konnten. Dies entspricht 0.8% der ursprünglich eingesetzten Vit.E-Menge. Die übrige Radioaktivität wurde an die Glasoberfläche gebunden und konnte durch Ausspülen mit Aethanol eluiert werden (Gesamt-Ausbeute: 95%). Bei den Serumproteinen hingegen blieben durchschnittlich 97% des gebundenen Vit.E in Lösung und nur ein sehr geringer Teil wurde an die Glaswand readsorbiert.

Aus diesen Resultaten wurde eine Technik abgeleitet, die geeignet ist, Vit.E mit einer Ausbeute von 16-58% (je nach eingesetztem Serumprotein) an Trägerproteine zu binden und so in physiologische Lösung zu bringen:

Vit.E, in äthanolischer Lösung, wird in einem Glasgefäß unter Stickstoff eingeeengt und mit einem mindestens 5x molaren Ueberschuss an Serumalbumin-oder Lipoproteinlösung in wässriger Lösung während 4 Stunden bei 37°C geschüttelt. Anschliessend wird das gelöste, nicht proteingebundene Vit.E durch Transfer der Proteinlösung in ein zweites Glasgefäß und nochmaliger Inkubation bei 4°C, über Nacht aus der Lösung eliminiert.

### 3.2. Oxidation von Vit.E

#### 3.2.1. Oxidation in organischen Lösungsmitteln

##### 3.2.1.1. Oxidation mit $\text{FeCl}_3$

22  $\mu\text{M}$  Vit.E wurde mit 10 mM  $\text{FeCl}_3$  während einer Stunde oxidiert. Die Edukte und Produkte wurden anschliessend mit HPLC aufgetrennt. Abb.24 zeigt die HPLC-Chromatogramme vor und nach der Oxidation.

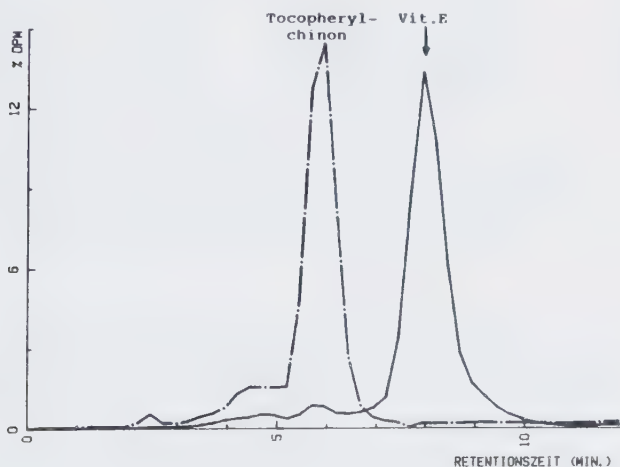


Abb.24: HPLC-Chromatographie von 22  $\mu\text{M}$  Vit.E vor (—) und nach (— · —) einstündiger Oxidation mit 10mM  $\text{FeCl}_3$  in äthanolischer Lösung (75%) bei RT. HPLC-Bedingungen: Tab.5B  
% Dpm = Dpm pro Fraktion / Dpm total eluiert  
Ausbeute der Oxidation und Chromatographie = 95%

Abbildung 24 zeigt, dass Vit.E in äthanolischer Lösung in einer Stunde vollständig oxidiert werden kann. Das Oxidationsprodukt konnte als Tocopherylchinon, durch seine charakteristische Retentionszeit und sein UV-Absorptionsspektrum, identifiziert werden (siehe 3.5.3.3.). In der oxidierten Probe wurde 95% der, auf HPLC aufgetragenen Radioaktivität eluiert, was zeigt, dass 5% der Oxidationsprodukte der Detektion entgangen sind.

Die Stöchiometrie der Produktbildung in Abhängigkeit der  $\text{FeCl}_3$ -Konzentration ist in Abb. 25 dargestellt. Bei einem molaren Vit.E zu  $\text{FeCl}_3$ -Verhältnis von 1:2 konnte 90% des Vit.E oxidiert werden.

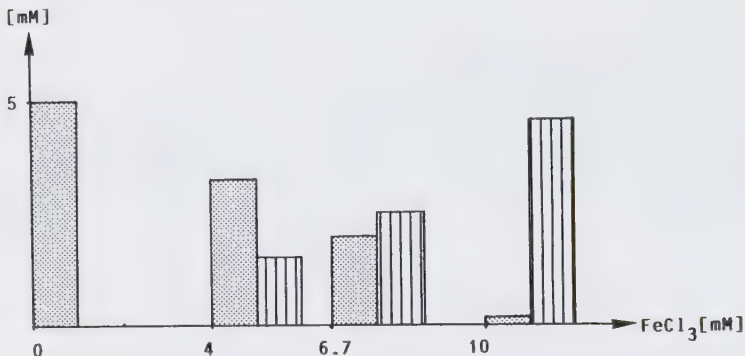


Abb.25: Stöchiometrie der Oxidation von Vit.E durch  $\text{FeCl}_3$ . 5 mM Vit.E wurde mit variablen  $\text{FeCl}_3$ -Konzentrationen während 60 Minuten in äthanolischer Lösung (75%) zu Tocopherylchinon oxidiert und mittels HPLC analysiert (siehe 2.4.1.).

Abbildung 26 zeigt die Kinetik der Reaktion von 5 mM Vit.E mit 10 mM  $\text{FeCl}_3$ . Es konnte 99% der eingesetzten Vit.E-Menge wiedergefunden werden.

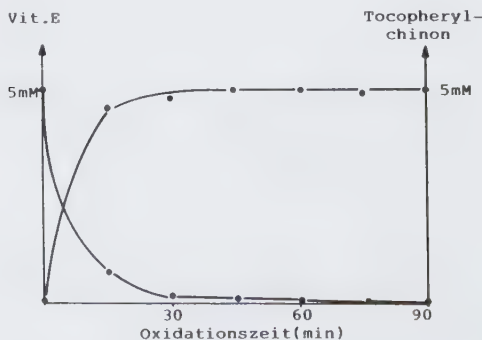


Abb.26: Kinetik der Oxidation von Vit.E durch  $\text{FeCl}_3$ . 5mM Vit.E wurden mit 10 mM  $\text{FeCl}_3$  während 90 Minuten in aethanolischer Lösung (75%) oxidiert und mittels HPLC analysiert (siehe 2.4.1.).

### 3.2.1.2. Oxidation mit $\text{CuSO}_4$

Vit.E, gelöst in Aethanol, wurde mit  $\text{CuSO}_4$  in Wasser oxidiert. Die Produkte wurden extrahiert und auf HPLC mit Methanol als Elutionsmittel analysiert (siehe Tab.5C). In Abbildung 27 sind Beispiele von HPLC-Chromatogrammen vor und nach der Oxidation dargestellt. Die Integration des Chromatogrammes zeigt, dass nur 30%, der auf die HPLC-Säule aufgetragenen Radioaktivität, eluiert werden kann. Auch durch Verlängerung der Elution konnte die Ausbeute nicht verbessert werden.

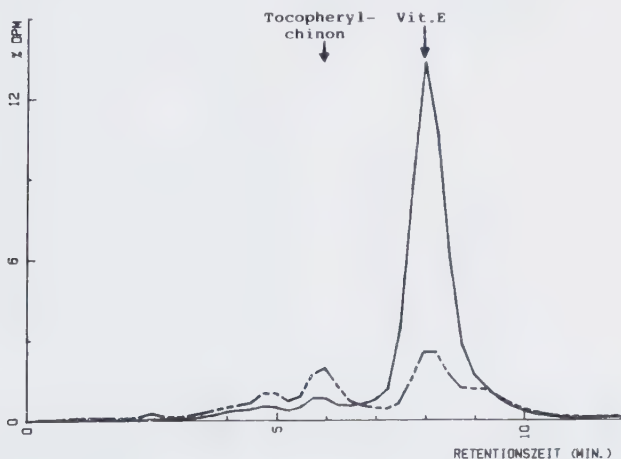


Abb. 27: HPLC-Chromatographie von 25  $\mu\text{M}$  Vit.E vor (—) und nach (---) der Oxidation mit 20 mM  $\text{CuSO}_4$  in aethanolischer Lösung (10%) (2.4.2.1.).

HPLC Bedingungen: Tab.5C.

% Dpm = % Dpm pro Fraktion / Dpm total eluiert.

Ausbeute der Chromatographie = 30%.

Zur Optimierung des HPLC-Systems wurden RP-2, RP-8 bzw. RP-18 als Säulenmaterialien und Hexan, Acetonitril, Methanol bzw. 2-Propanol als Elutionsmittel getestet. Als ideales HPLC-System zur Chromatographie von  $\text{CuSO}_4$ -Oxidationsprodukten wurde die Kombination einer RP-18-Säule mit 2-Propanol als Elutionsmittel ermittelt.

Abbildung 28 zeigt das optimierte HPLC-Chromatogramm der gleichen  $\text{CuSO}_4$ -Oxidationsprodukte. Vit.E und Tocopherylchinon mit den Retentionszeiten von 5.9 bzw. 5.1 Minuten konnten unter diesen Bedingungen praktisch nicht voneinander getrennt werden. Dagegen konnte die Ausbeute der Chromatographie auf 92% gesteigert werden. Mit einer Retentionszeit von 15 Minuten wurde ein neues Oxidationsprodukt eluiert, das wir im Folgenden als 15'-Oxidationsprodukt bezeichnen werden.

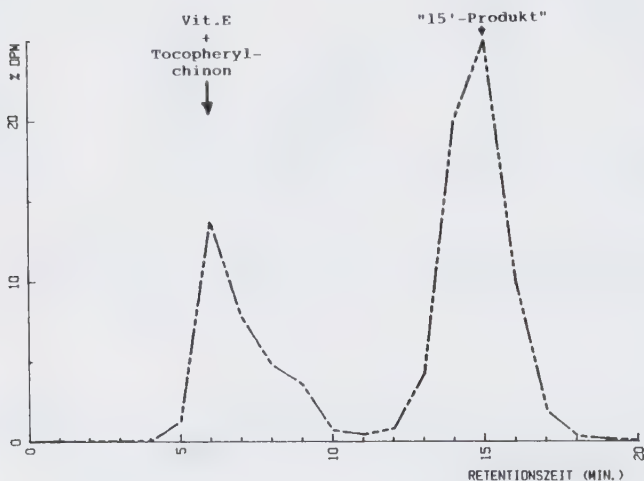


Abb. 28: HPLC-Chromatogramm von Vit.E-Oxidationsprodukten nach Oxidation mit  $\text{CuSO}_4$ . Chromatographische Bedingungen: RP-18 Säule mit 2-Propanol als Elutionsmittel (siehe Tab.5D) % Dpm = Dpm pro Fraktion / Dpm total eluiert. Ausbeute der Chromatographie = 92%.

Vit.E wurde, wie bereits oben erwähnt, zur Oxidation in Aethanol gelöst addiert. Die Alkoholkonzentration betrug in diesen Experimenten 10%.

Engte man Vit.E unter Stickstoff ein, solubilisierte es anschliessend mit 0.2% Deoxycholat (DOC) in NaCl-Tris-Puffer und oxidierte es mit  $\text{CuSO}_4$  unter identischen Bedingungen, so konnte nur ein Oxidationsprodukt detektiert werden (Abb.29C). Das 15'-Oxidationsprodukt wurde nicht mehr gebildet.

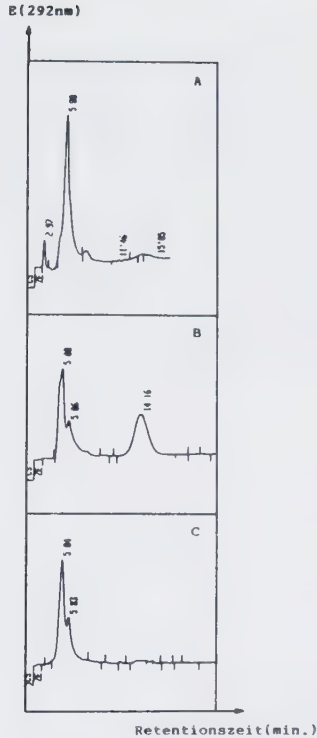


Abb.29: Vergleich der Oxidationsprodukte nach  $\text{CuSO}_4$ -Oxidation von 25  $\mu\text{M}$  Vit.E in Gegenwart und Abwesenheit von Aethanol mit HPLC-Chromatographie (Elutionsmittel:2-Propanol,Bedingungen siehe Tab.5D)  
A: Vit.E vor Oxidation  
B: Bildung von Tocopherylchinon und 15'-Oxidationsprodukt in Gegenwart von 10% Aethanol.  
C: Bildung von Tocopherylchinon in Abwesenheit von Aethanol.

Abbildung 29 zeigt, dass das 15'-Oxidationsprodukt ein Artefakt ist, der nur in Gegenwart von Alkohol als Lösungsmittel für Vit.E auftritt. Führt man die Oxidation mit  $\text{CuSO}_4$  in Abwesenheit von Alkohol durch, gemäss Abschnitt 2.4.2.2., so bildet sich aus dem Edukt Vit.E (Abb.29A) ausschliesslich Tocopherylchinon (Abb.29C), während in Anwesenheit von 10% Aethanol, wie Abbildung 29B zeigt, das bereits beschriebene 15'-Oxidationsprodukt gebildet wird.

Betrachtet man die Absorptionsspektren der Edukte und Produkte (Abb.30A), vor und nach der  $\text{CuSO}_4$ -Oxidation von Vit.E solubilisiert in DOC, und vergleicht diese mit Standardspektren von Vit.E und Tocopherylchinon (Abb.30B), so wird ersichtlich, dass es sich bei dem einzigen durch HPLC nachweisbaren Oxidationsprodukt um Tocopherylchinon handelt.



Abb.30A:  
Absorptionsspektren der Hexanextrakte vor (—) und nach (---) der  $\text{CuSO}_4$ -Oxidation von 500  $\mu\text{M}$  Vit.E solubilisiert in DOC (siehe 2.4.2.2).

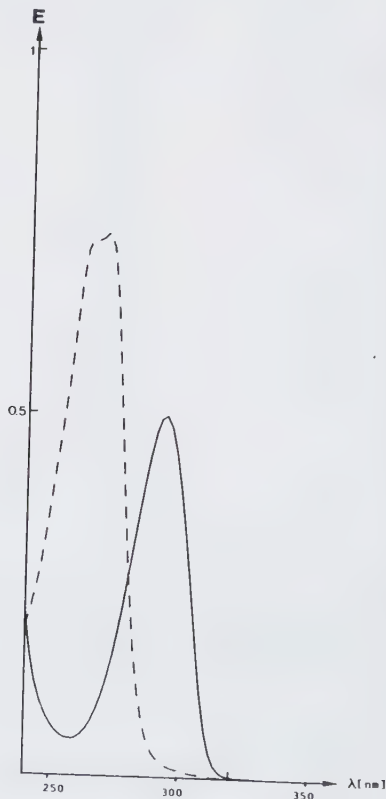


Abb.30B:  
Standardspektren von Vit.E (154  $\mu\text{M}$ ) (—) und Tocopherylchinon (39.1  $\mu\text{M}$ ) (---) in Aethanol.

### 3.2.2. Oxidation unter physiologischen Bedingungen mit dem XOD-System

Abbildung 31 zeigt ein typisches HPLC-Chromatogramm der Produkte, die aus DOC-solubilisiertem Vit.E nach Oxidation unter physiologischen Bedingungen mit dem radikalgenerierenden XOD-System gebildet werden (siehe 2.5.1.). Da hier verschiedene Oxidationsprodukte mit geringeren Polaritäten auftraten, wurde zur besseren Trennung der Produkte 6% Wasser in Methanol als Elutionsmittel gewählt. Unter den gebildeten Oxidationsprodukten konnte der 16'-Peak, durch seine Retentionszeit in zwei verschiedenen Elutionssystemen, als Tocopherylchinon identifiziert werden.

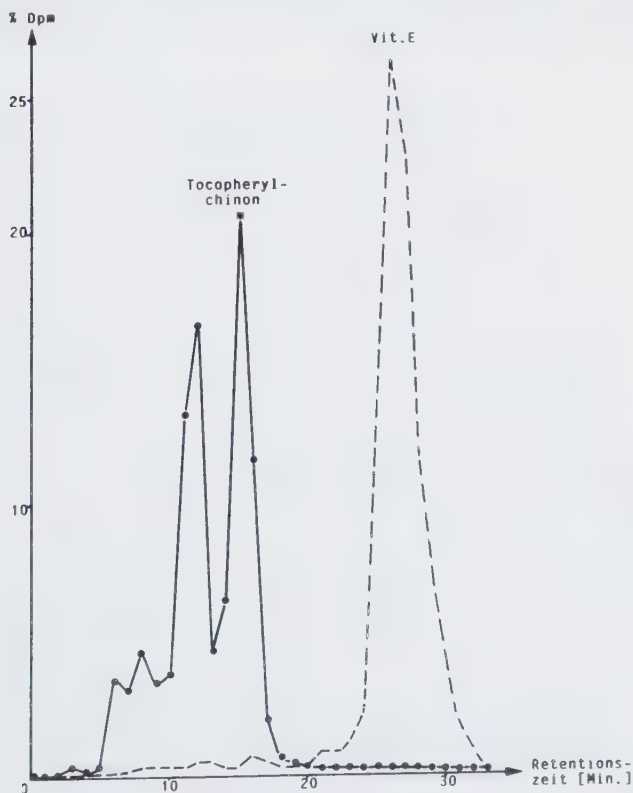


Abb.32: HPLC-Analyse von DOC-solubilisiertem Vit.E (---) und dessen Oxidationsprodukten (—) nach Oxidation mit dem XOD-System. HPLC-Bedingungen: Siehe Tab.5E.  
% Dpm = Dpm pro Fraktion / Dpm total eluiert.  
Die Ausbeute der Chromatographie betrug  $85 \pm 8.4\%$  ( $n=11$ ).

### 3.2.3. Anwendung der 3 Oxidationssysteme auf Erythrocyten.

EC wurden in physiologischem NaCl-Tris-Puffer (HK ca.40) mit den beschriebenen Oxidationssystemen:  $\text{FeCl}_3$  (1mM),  $\text{CuSO}_4$  (1mM) und dem XOD-System oxidiert. Zur Oxidation mit Metallsalzen wurden zu je 2ml EC-Suspension 100 $\mu\text{l}$  einer 10mM  $\text{FeCl}_3$ - oder  $\text{CuSO}_4$ -Lösung in Wasser addiert und mit der gleichen, für das XOD-System beschriebenen Methode, inkubiert und analysiert.

In keinem der beschriebenen Systeme konnte eine Vit.E-Oxidation gefunden werden. In allen drei Ansätzen konnte jedoch eine Met-Hb-Bildung (Braunfärbung der oxidierten Proben) beobachtet werden.

Bei der Oxidation mit dem XOD-System wurde zusätzlich zur Vit.E-Konzentration die Xanthin- und Met-Hb-Konzentration in den Inkubationsansätzen bestimmt (Tabelle 7).

| EC             | [Vit.E]/ECgep.<br>$\mu\text{Mol/l}$ | [Xanthin]<br>mM | [Met-Hb]<br>mM | %  |
|----------------|-------------------------------------|-----------------|----------------|----|
| vor Oxidation  | 5.8                                 | 2.3             | 0.1            | 1  |
| nach Oxidation | 5.75                                | 0.08            | 2.25           | 23 |

Tab.7: Oxidation von intakten EC mit dem XOD-System.

Oxidation: siehe 2.5.1.

Die Xanthin-Konzentration wurde, nach Abzentrifugieren der zellulären Bestandteile, im Inkubationsüberstand (2.5.2.) gemessen.

Die Met-Hb-Konzentration wurde mit einem Corning 2500 CO-Oximeter bestimmt.

Aus Tabelle 7 geht hervor, dass im XOD-System die gesamte Radikalproduktion [Xanthin-Abnahme: 2.22mM] zur Oxidation von Hb verwendet wurde [Met-Hb-Zunahme: 2.15mM].

In intakten EC kann Vit.E mit keinem der drei beschriebenen Systeme oxidiert werden, weshalb nach einem Weg gesucht wurde, die alternativen antioxidativen Schutzmechanismen des EC (Hb, Enzyme, GSH, Vit.C) von dem zu untersuchenden Vit.E-System zu trennen.

### 3.2.4. Anwendung der 3 Oxidationssysteme auf Erythrocyten-Membranen

EC-Membranen wurden in physiologischem NaCl-Tris-Puffer (1 mg EC- Protein / ml) mit den beschriebenen Oxidationssystemen :  $\text{FeCl}_3$  (1 mM),  $\text{CuSO}_4$  (1 mM) und dem XOD-System oxidiert (Abb.33).

Die Resultate in Abbildung 33 zeigen, dass nur mit dem XOD-System eine vollständige Oxidation von Vit.E erreicht werden konnte. Nach 4-stündiger Reaktionszeit wurde bei der Oxidation mit dem XOD-System kein Vit.E mehr detektiert, während bei der  $\text{FeCl}_3$ - oder  $\text{CuSO}_4$ -Oxidation die Vit.E-Abnahme in dieser Zeitspanne nur ca. 25% betrug.

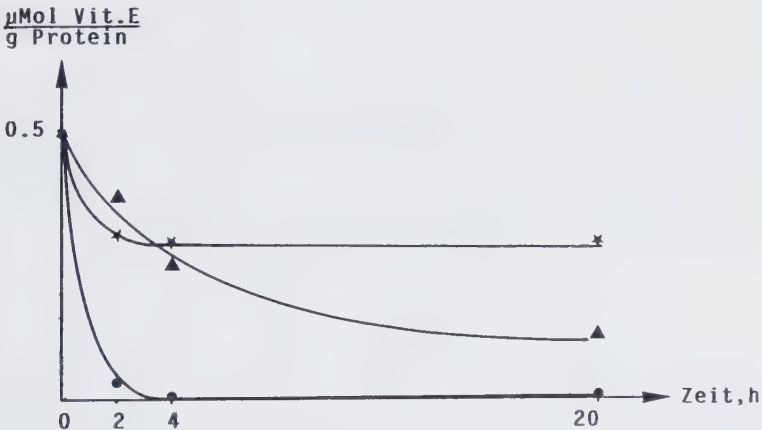


Abb.33: Oxidation von Vitamin E in isolierten EC-Membranen durch 1mM  $\text{FeCl}_3$  (■), 1mM  $\text{CuSO}_4$  (▲) und dem XOD-System (●). Die Oxidation mit dem XOD-System wurde nach 2.5.1. durchgeführt. Zur Oxidation mit Metallsalzen wurden zu je 1 ml der Membran-Suspension (1mg EC-Protein/ml) 100  $\mu\text{l}$  einer 10 mM  $\text{FeCl}_3$ - oder  $\text{CuSO}_4$ -Lösung in Wasser addiert und mit der gleichen, für das XOD-System beschriebenen Methode, inkubiert und analysiert.

Das XOD-System ermöglicht die Oxidation von EC-Membran-gebundenem Vit.E unter physiologischen Bedingungen, d.h. isotoner wässriger Lösung bei pH 7.4, durch kontinuierliche Radikalproduktion. Alle weiteren Oxidationen dieser Arbeit wurden deshalb mit dem XOD-System durchgeführt.

### 3.3. Oxidation von Vit.E im Plasma und gebunden an Plasma-proteine

Alle Oxidationen wurden mit dem XOD-System durchgeführt. Dabei wurde zur Ueberprüfung des radikalgenerierenden Systems immer parallel eine Oxidation einer ungefähr gleichkonzentrierten Vit.E-Lösung, solubilisiert in DOC, durchgeführt (=externe Reaktionsprüfung). Zudem wurde, wenn nötig, die Xanthinkonzentration und damit der Xanthinverbrauch direkt im Oxidationsansatz bestimmt, um das Funktionieren des Oxidationssystems zu kontrollieren (= interne Reaktionsprüfung).

#### 3.3.1. Oxidation im Plasma

Natürliches Vit.E in frischem Plasma und Vit.E solubilisiert mit DOC wurde mit dem XOD-System oxidiert. Vor der Oxidation und nach 2-stündiger Oxidation wurden Proben aus dem Inkubationsansatz entnommen und analysiert. Zusätzlich wurden Xanthin-Bestimmungen zur Ueberprüfung der Aktivität des radikalgenerierenden Systems durchgeführt (Tab.8).

|                    | [Vit.E]-Abnahme<br>(2 Std.) |                   | [Xanthin]-Abnahme<br>(2 Std.) |                   |
|--------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
|                    | %                           | $\mu\text{Mol/l}$ | %                             | $\mu\text{Mol/l}$ |
| Vit.E<br>in Plasma | 3-5                         | 2.2               | 95                            | 1900              |
| Vit.E<br>in DOC    | 99                          | 44                | 43                            | 880               |

Tab.8: Oxidation von plasmagebundenem Vit.E (41.5  $\mu\text{M}$ ) und in DOC solubilisierten Vit.E (44 $\mu\text{M}$ ) mit dem radikalgenerierenden XOD-System während 2 Stunden (siehe 2.5.1.). (Xanthin-Ueberschuss im Vergleich zu Vit.E: > 20)

Tabelle 8 zeigt, dass im Plasma während der 2-stündigen Oxidationszeit trotz doppeltem Xanthin-Verbrauch und damit doppelter Radikalproduktionsgeschwindigkeit als in DOC praktisch kein Vit.E oxidiert werden kann. In DOC hingegen konnte nach dieser Reaktionszeit kein Vit.E mehr detektiert werden.

### 3.3.2. Oxidation von Vit.E, gebunden an Plasmaproteine

Zur Untersuchung der Oxidation von Vit.E, gebunden an Plasmaproteine, wurde die beschriebene radikalvermittelte Oxidation durch XOD (siehe 2.5.1.) angewandt. Tritium markiertes Vit.E wurde wie beschrieben (2.5.1., 2.7.2.) solubilisiert (DOC) oder proteingebunden (SA, VLDL, LDL, HDL) und von nicht gebundenem Vit.E befreit. Nach Inkubation mit dem XOD-System wurden die Vit.E-Derivate durch HPLC analysiert.

#### 3.2.1. Oxidation von Vit.E gebunden an Serumalbumin

Serumalbumin wurde in physiologischer Konzentration (0.6mM) eingesetzt. Bei der Bindung von tritiiertem Vit.E ergab sich ein Verhältnis von 0.003 Mol  $^3\text{H}$ -Vit.E/Mol SA. Abbildung 34 vergleicht die Oxidationsprodukte von SA-gebundenem und DOC solubilisiertem (3.8  $\mu\text{M}$  in 0.2% DOC) Vit.E. HSA und BSA wurden als Bindungsproteine verglichen. Da jedoch keine nennenswerten Unterschiede gefunden wurden (Daten nicht gezeigt), wurden alle folgenden Experimente mit HSA durchgeführt.

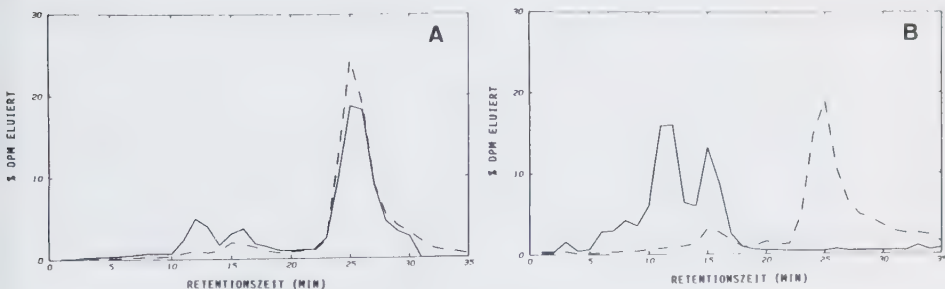


Abb.34: Beispiel einer HPLC-Analyse der Oxidation von serumalbumin-gebundenem und in DOC-solubilisiertem Vit.E. Die Ausbeute der Chromatographien betrug  $87.3 \pm 6.2\%$  ( $n=8$ ).

34A:  $^3\text{H}$ -Vit.E (0.003 Mol/Mol Protein) an Serumalbumin (0.6mM) gebunden vor (---) und nach (—) 4-stündiger Oxidation mit dem XOD-System.

34B:  $^3\text{H}$ -Vit.E (3.8 $\mu\text{M}$ ) in 0.2% DOC vor (---) und nach (—) 4-stündiger Oxidation mit dem XOD-System.

Es zeigt sich, dass während der 4-stündigen Inkubation 16-20% des SA-gebundenen Vit.E oxidiert wurde, während das, in DOC solubilisierete Vit.E praktisch vollständig (>99%) oxidiert wurde. Aus dem Vergleich der Oxidation von SA-gebundenem und in DOC solubilisiertem Vit.E geht hervor, dass SA-gebundenes Vit.E vor Oxidation geschützt ist.

Der unerwartete Befund eines Oxidationsschutzes von Vit.E durch Bindung an Serumalbumin verlangte nach einer Abklärung der Ursache, die zwei Gründe haben kann:

1. Schutz vor Oxidation durch Bindung von Vit.E an Serumalbumin
2. Bevorzugte Oxidation der leicht oxidierbaren Sulfhydryl(SH-)-Gruppen von Serumalbumin

Um dies abzuklären wurden während der 4-stündigen Oxidationszeit zusätzlich zur Vit.E-Bestimmung die SH-Gruppen titriert und die Xanthinkonzentration gemessen (Abb.35).

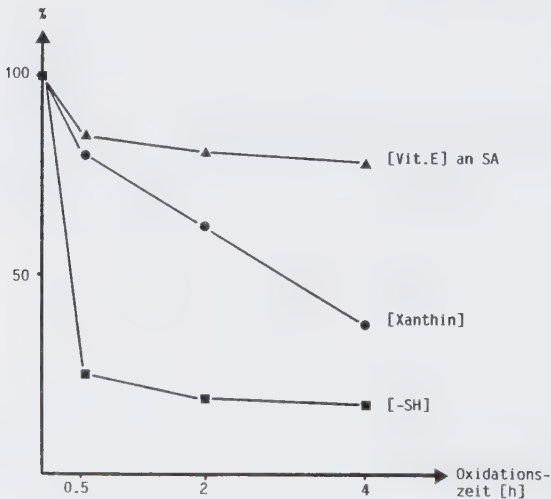


Abb.35: Bestimmung der Xanthin- (●)(siehe 2.5.2.) und Sulfhydrylgruppen-Konzentration (■)(siehe 2.9.), während einer 4-stündigen Oxidation mit dem XOD-System (siehe 2.5.1.) von 20  $\mu$ M Vit.E gebunden an 100  $\mu$ M SA (▲) in PBS-Puffer, in Prozent der Anfangskonzentration.

Nach einer Oxidationszeit von 0.5 Stunden konnten nur noch ca. 20 % der titrierbaren SH-Gruppen bestimmt werden. Obschon während der restlichen 3.5 Stunden ein konstanter Xanthinverbrauch gemessen wurde, nahm die Konzentration von Vit.E, gebunden an Serumalbumin, nach der Oxidation der SH-Gruppen nicht weiter ab. Diese Ergebnisse schliessen die Möglichkeit, dass der Oxidationsschutz von Vit.E durch konkurrierende Oxidation von Protein-SH-Gruppen bewirkt wird, aus.

### 3.3.2.2. Oxidation von Vit.E gebunden an Lipoproteine

Die Konzentrationen der Lipoproteine (2.7.1.) wurden so gewählt, dass sie im Bereich physiologischer Plasmakonzentrationen lagen [10]. In Tabelle 9 sind die Konzentrationen der einzelnen Lipoproteine und des gebundenen  $^3\text{H}$ -Vit.E (2.7.2.) zusammengestellt.

|      | [LP]<br>g/l | [ $^3\text{H}$ -Vit.E]<br>$\mu\text{Mol/l}$ |
|------|-------------|---------------------------------------------|
| VLDL | 1.5         | 0.4                                         |
| LDL  | 4.5         | 0.4                                         |
| HDL  | 5.1         | 3.5                                         |

Tab.9: Konzentration der zur Oxidation eingesetzten Lipoproteine und deren gebundene Vit.E-Konzentration.

Die Oxidation der Lipoproteine wurde in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt, wovon ein repräsentatives Beispiel in Abbildung 36 A-C dargestellt ist. Die Lipoproteine und parallel dazu DOC-solubilisiertes Vit.E (siehe 3.3.2.1) wurden mit dem XOD-System während 4 Stunden oxidiert (Abb.36) und durch HPLC-Chromatographie analysiert (siehe Tab.5E). Die Ausbeute der Chromatographien betrug für alle Lipoproteine  $92.8 \pm 5.9\%$  ( $n=8$ ).

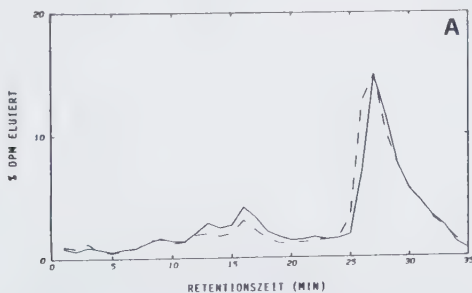


Abb. 36A: Oxidation von Vit.E gebunden an VLDL.  $^3\text{H}$ -HPLC-Analyse (gemäss Tab.5E) von  $0.4 \mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Vit.E gebunden an VLDL ( $0.26 \mu\text{Mol/g LP}$ ) vor (---) und nach (—) 4-stündiger Oxidation mit XOD-System (siehe 2.5.1.).  
 $\% \text{ Dpm} = \text{Dpm pro Fraktion} / \text{Dpm total eluiert}.$

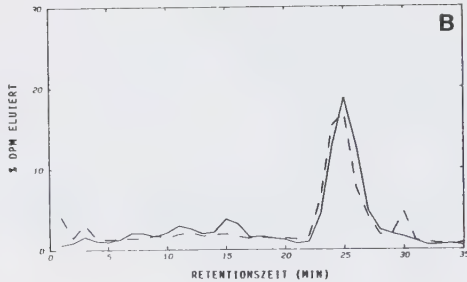


Abb.36B: Oxidation von Vit.E, gebunden an LDL.  $^3\text{H}$ -Vit.E gebunden an LDL ( $0.09 \mu\text{Mol/g LP}$ ) vor (---) und nach (—) 4-stündiger Oxidation mit XOD-System (siehe 2.5.1.).  
% Dpm = Dpm pro Fraktion / Dpm total eluiert.

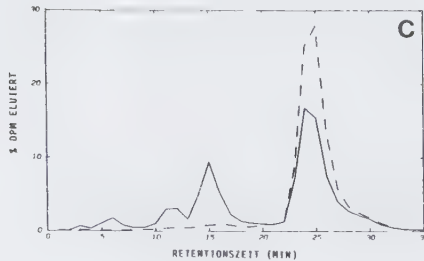


Abb.36C: Oxidation von Vit.E, gebunden an HDL.  $^3\text{H}$ -Vit.E gebunden an VLDL ( $0.69 \mu\text{Mol/g LP}$ ) vor (---) und nach (—) 4-stündiger Oxidation mit XOD-System (siehe 2.5.1.).  
% Dpm = Dpm pro Fraktion / Dpm total eluiert.

In DOC (Abb.34B) konnte innerhalb 4 Stunden über 99% des Vit.E oxidiert werden. Hingegen wurde bei VLDL- (Abb. 36A), LDL- (Abb.36B) und HDL- (Abb.36C) gebundenem Vit.E nur ein geringer Teil oxidiert, der grösste Teil war vor Oxidation geschützt (Tab.10). Vit.E ist also auch durch Bindung an Lipoproteine vor Oxidation geschützt.

| Vit.E in/an  | % Vit.E oxidiert |
|--------------|------------------|
| 0.2% DOC     | 99%              |
| 0.6 mM SA    | 16-20%           |
| 1.5 g/l VLDL | 5-9%             |
| 4.5 g/l LDL  | 6-9%             |
| 5.1 g/l HDL  | 22-31%           |

Tab.10: Oxidation von Vit.E, solubilisiert in DQ<sub>3</sub>C oder gebunden an Serumproteine, in % des eingesetzten H-Vit.E.

### 3.4. Uebertragung von Vit.E auf Erythrocyten

#### 3.4.1. Uebertragung von Vit.E auf Erythrocyten durch Serumalbumin

HSA, gelöst in physiologischem Puffer, wurde mit Vit.E beladen und mit gewaschenen und gepackten EC während 32 Stunden inkubiert. Dem Reaktionsansatz wurde zusätzlich 10mM Glukose zur Aufrechterhaltung des EC-Stoffwechsels zugefügt. Der HK in den Inkubationsansätzen betrug ca. 35, die Vit.E-Konzentration variierte zwischen 0 und 286 nmol/ml. Der pH-Wert lag während der gesamten Reaktionszeit zwischen 7.4 und 7.1, die Glucose-Konzentration wurde durch Zugabe von Glukose stets über 1mM gehalten und die Echinocytenzahl (bestimmt durch Auszählen unter dem Mikroskop) betrug bis zu der Inkubationszeit von 28 Stunden bis ca.10%, bei 32 Stunden 25%. Die Zunahme der EC-Vit.E-Konzentration ist in Abbildung 37 dargestellt.

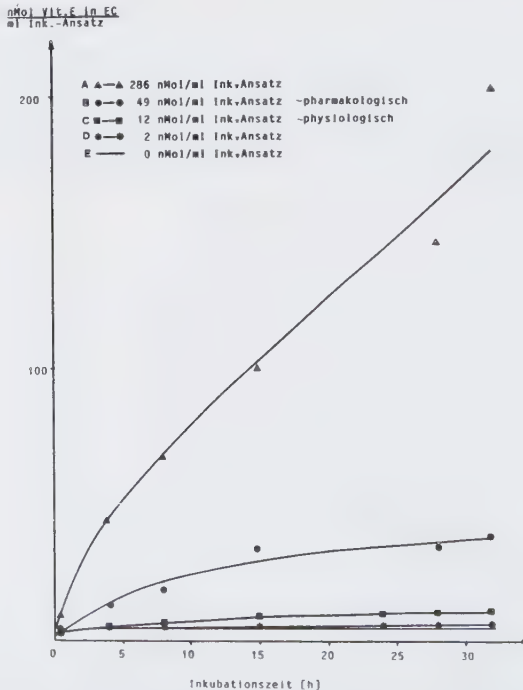


Abb.37: Vit.E-Uebertragung durch Serumalbumin auf EC. 0.6 mM HSA, gelöst in Na-P-Puffer wurde mit Vit.E beladen (2.7.2.) und mit gewaschenen und gepackten EC während 32 Stunden inkubiert (HK ca. 35). EC-Proben wurden zu verschiedenen Zeiten entnommen, 3 Mal mit Na-P-Puffer gewaschen, Vit.E extrahiert (2.3.2.) und mit HPLC analysiert (2.3.3, Tab.5A).

Die Resultate zeigen, dass serumalbumingebundenes Vit.E praktisch vollständig auf die EC übertragen wird. Bei 2 und 12 nmol Vit.E/ml Inkubationsansatz waren die Ueberstände nach 32-stündiger Inkubationszeit absolut Vit.E-frei, bei 49 und 286 nmol/ml enthielten sie jedoch noch 10 resp. 15% des eingesetzten Vit.E. Aufgrund der nach 32 Stunden immer noch zunehmenden Vit.E-Konzentration in EC scheint in den beiden hochkonzentrierten Inkubationsansätzen die Reaktionszeit für eine vollständige Vit.E-Uebertragung offensichtlich zu kurz zu sein.

Diese Bindungsexperimente zeigen, dass im Bereich physiologischer (15-30  $\mu\text{M}$ , Inkubationsansatz C) und pharmakologischer (30-100  $\mu\text{M}$ , Inkubationsansatz B) Vit.E-Konzentrationen kein Gleichgewicht zwischen Serumalbumin und EC-Membranen erreicht werden kann (siehe Abb.37). Ebenso wenig konnte mit den untersuchten Konzentrationen eine Membransättigung mit Vit.E erreicht werden. Es konnten so EC-Vit.E-Spiegel, die die Normal-Konzentration 100 Mal überstiegen, erzeugt werden.

#### 3.4.2. Uebertragung von Vit.E auf Erythrocyten durch Lipoproteine

##### 3.4.2.1. Vit.E-Bindungs-kapazität der Lipoproteine in vivo im menschlichen Plasma.

Lipoproteine wurden aus frischem Plasma isoliert (2.7.1.) und deren Reinheit mittels Elektrophorese [100] überprüft.

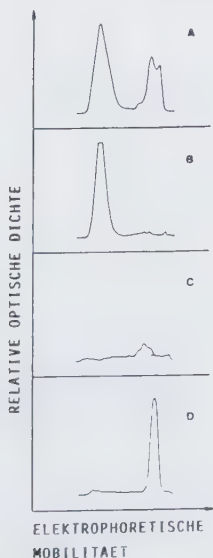


Abb.38:  
Densitogramme von  
Lipoprotein-  
Elektrophoresen [100].  
(Isolierung:2.7.1.)  
A: Lipoproteine nach  
    Ultrazentrifugation  
B: Gereinigtes HDL  
C: Gereinigtes VLDL  
D: Gereinigtes LDL

Die Konzentration der einzelnen Lipoproteine in den aufkonzentrierten Lösungen wurde durch Proteinmessung bestimmt (2.7.1.). Vit.E wurde extrahiert (2.3.1.) und mittels HPLC quantitativ analysiert (Tab.5A). In Tabelle 11 sind die Lipoprotein- und Vit.E-Konzentrationen, sowie deren Verhältnis zueinander im nativen Plasma aus zwei unabhängigen Lipoproteinpräparationen des gleichen Spenders dargestellt.

| LP   | [LP]<br>g/l | [Vit.E]<br>µMol/l | [Vit.E]/[LP]<br>µMol/g |
|------|-------------|-------------------|------------------------|
| VLDL | 3.75        | 4.6               | 1.23                   |
| LDL  | 4.7         | 14.0              | 2.98                   |
|      | 5.8         | 11.4              | 1.97                   |
| HDL  | 5.9         | 13.5              | 2.29                   |
|      | 6.0         | 9.3               | 1.55                   |

Tab.11: Lipoprotein- (2.7.1.) und Vit.E-Konzentrationen (2.3.1) in den gereinigten Lipoprotein-Fraktionen, isoliert aus zwei unabhängigen Präparationen des gleichen Spenders.

#### 3.4.2.2. Uebertragung von lipoproteingebundenem Vit.E im Vergleich zu serumalbumingebundenem Vit.E auf Erythrocyten

<sup>3</sup>H-markiertes Vit.E, an Lipoproteine oder SA gebunden (siehe:2.7.2.), wurde mit frischen, gewaschenen EC unter konstanten experimentellen Bedingungen (pH 7.4, 10 mM Glucose) inkubiert. Die Uebertragung von Vit.E während der Reaktionszeit (24 Std./37°C) wurde durch Messung der EC-gebundenen, durch wässrige Medien nicht auswaschbare, Radioaktivität ermittelt (2.3.2.,2.3.3.).

In der Abbildung 39 sind Messwerte aus drei verschiedenen Lipoproteinisolierungen zusammengefasst. Die grösste Menge Vit.E, total 90%, konnte durch HSA auf die EC übertragen werden. VLDL mit 44% Uebertragung, LDL mit 40% und HDL mit 25% Uebertragung folgten.

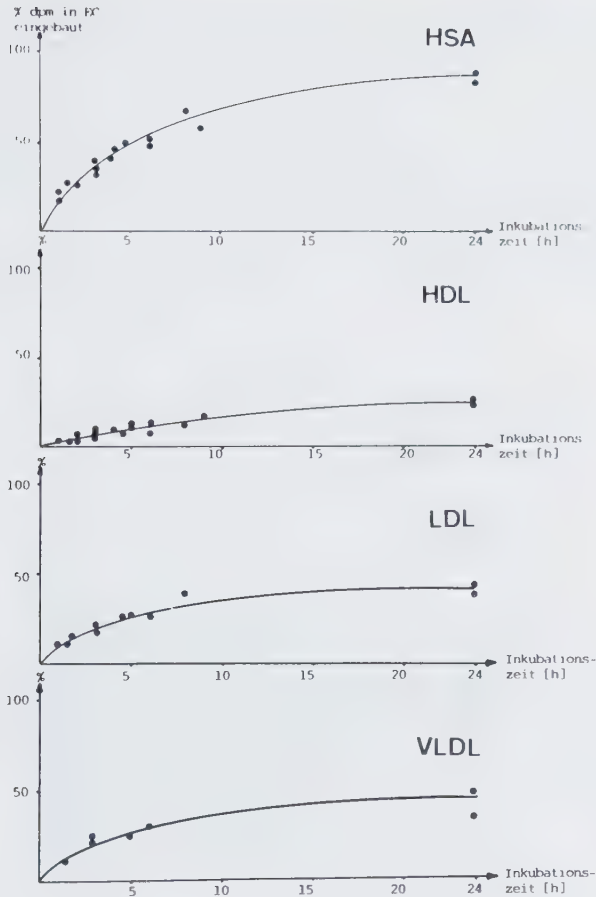


Abb.39: Uebertragung von Vit.E von Serumproteinen auf EC. Einbau von  $^3\text{H}$ -Vit.E (% der ursprünglich an Serumproteine gebundenen Radioaktivität) während 24 Stunden/37°C (HK:35). Eingesetzte Konzentrationen der Serumproteine (SP) und des gebundenen Vit.E:

|       | SP           | $^3\text{H}$ -Vit.E   |
|-------|--------------|-----------------------|
| -HSA  | 0.6 mM       | 1.2-1.7 $\mu\text{M}$ |
| -VLDL | 1.5-1.95 g/l | 0.3-0.7 $\mu\text{M}$ |
| -LDL  | 4.0-7.70 g/l | 0.6-1.0 $\mu\text{M}$ |
| -HDL  | 2.7-4.80 g/l | 3.0-4.5 $\mu\text{M}$ |

### 3.5. Oxidation von Vit.E in EC-Membranen unter physiologischen Bedingungen

#### 3.5.1. Oxidation von EC-Membranen mit in vivo inkorporiertem Vit.E

EC-Membranen von 6 Probanden wurden mit dem XOD-System während 4 Stunden oxidiert (siehe 2.5.1). Die EC-Membranen wurden anschliessend gewaschen und die Vit.E- und Protein-Konzentrationen bestimmt (siehe 2.8. und Tab.5A). Die Ergebnisse sind in Tab.12 zusammengestellt. Die Vit.E-Konzentration wurde dabei auf die Proteinkonzentration der EC-Membranen bezogen.

|                | [Protein] | [Vit.E] <sub>EC-Membr.</sub> | [Vit.E]/[Prot.] |
|----------------|-----------|------------------------------|-----------------|
|                | g/l       | µMol/l                       | µMol/g          |
| vor Oxidation  | 1.74-2.52 | 1.71-3.06                    | 0.79-1.21       |
| nach Oxidation | 2.43-3.08 | 0.2                          | 0.08            |

Tab.12: Vit.E- resp. Protein-Konzentrationen in EC-Membranen vor und nach der Oxidation mit dem XOD-System (siehe 2.5.1.).

In allen 6 Experimenten konnte nach der 4-stündigen Oxidation kein Vit.E mehr gemessen werden (als Beispiel siehe Abb.40 B). Das Vit.E der EC-Membran konnte mit dem XOD-System vollständig oxidiert werden. Chromatographisch konnte ein Hauptprodukt dieser Oxidation nachgewiesen werden (Abb.40 C). Ein Produkt mit gleicher Retentionszeit wurde auch in der Oxidation von in DOC solubilisiertem Vit.E (siehe 3.2.2.) gefunden.

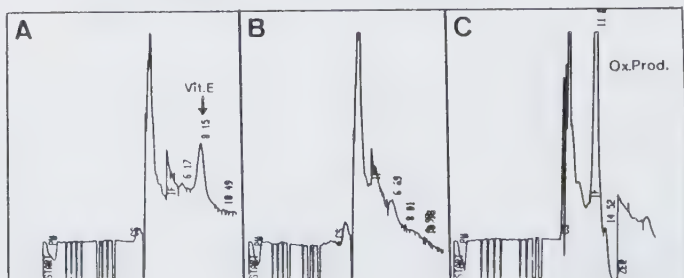


Abb.40: HPLC-Chromatogramme der Lipidextrakte vor und nach der Oxidation von EC-Membranen mit dem XOD-System.

- A: EC-Membranen vor Oxidation, Elutionsmittel 100% Methanol, Detektionswellenlänge 292 nm.
- B: EC-Membranen nach Oxidation, HPLC-Bedingungen wie A.
- C: EC-Membranen nach Oxidation, Elutionsmittel 6% Wasser in Methanol, Detektionswellenlänge 260 nm.

Zur Abklärung von Proteinveränderungen, die während der Oxidation auftreten können (siehe 1.2.2.1.), wurden die Membranproteine mit SDS-Gelelektrophoresen analysiert. Ein zunehmender Abbau der Spektrine (Bande I+II) wurde während der Oxidation von EC-Membranen mit dem XOD-System festgestellt (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass XOD in Abwesenheit ihres Substrates: Xanthin (Abb.41, Proben 2-5) oder in Gegenwart eines kompetitiven Inhibitors: Allopurinol (Probe 1) vergleichbare EC-Membranproteinveränderungen bewirkte, deutet darauf hin, dass nicht die oxidative Wirkung von XOD dafür verantwortlich ist. Die Hemmung dieses Effekts durch den Proteaseinhibitor pMSF (Probe 6) weist auf eine Proteolyse während der XOD-Vermittelten Oxidation von EC-Membranen hin.



Abb.41: SDS-Gelelektrophorese von EC-Membranproteinen, Wirkung von XOD.

Konzentrationen der Inkubationslösungen: EC-Membranen: 1mg/ml, XOD: 0.025 U/ml, Allopurinol: 20mM, pMSF 1mM

EC-Banden-Nummerierung nach [97]

- 1: EC-Membranen+XOD+Allopurinol
- 2: EC-Membranen+XOD(1/2 Std.Ink.,gesamtes Inkubationsgemisch)
- 3: EC-Membranen+XOD(1/2 Std.Ink.,gewaschene EC-Membranen)
- 4: EC-Membranen+XOD(5/2 Std.Ink.,gesamtes Inkubationsgemisch)
- 5: EC-Membranen+XOD(5/2 Std.Ink.,gewaschene EC-Membranen)
- 6: EC-Membranen+XOD+pMSF
- 7: EC-Membranen

### 3.5.2. Vergleich der Oxidationsprodukte aus Erythrozytenmembranen mit denen aus Deoxycholol.

Mit diesen Versuchen sollte geprüft werden, ob die komplexe Oxidation von Vit.E in EC-Membranen im einfacheren DOC-System simuliert werden kann.

$^3\text{H}$ -Vit.E wurde mit Hilfe von Serumalbumin als Trägerprotein in Membranen intakter EC eingebaut (siehe 2.6.2), anschliessend zu EC-Membranen weiterverarbeitet (siehe 2.6.1) und 4 Stunden mit dem XOD-System oxidiert (siehe 2.5.1). Als Vergleich wurde DOC-solubilisiertes  $^3\text{H}$ -Vit.E mit den gleichen Bedingungen oxidiert. Abbildung 42 zeigt ein Beispiel eines HPLC-Chromatogrammes der in EC-Membranen und DOC gebildeten Oxidationsprodukte. Das gezeigte Muster der Oxidationsprodukte konnte mehrfach bestätigt werden.

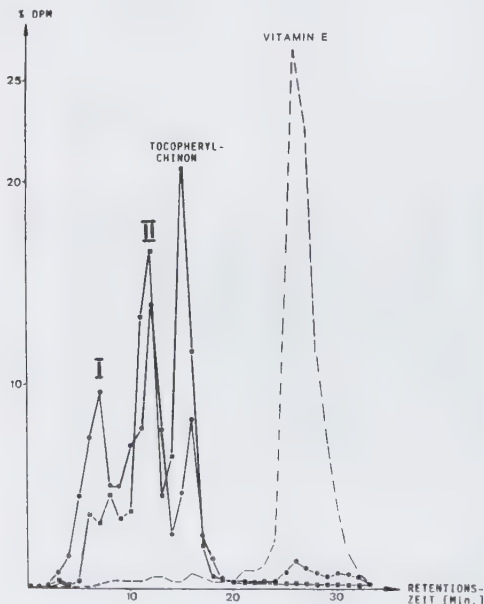


Abb.42: HPLC-Analyse von Vit.E vor (---) und nach der Oxidation in EC-Membranen (●—●) und DOC (■—■) mit dem XOD-System.

HPLC-Bedingungen: siehe Tab.5E

% Dpm = Dpm pro Fraktion / Dpm total eluiert.

Ausbeute der Chromatographie: -DOC  $85.8 \pm 8.8\%$  (n=20)

-EC-Membranen  $85.8 \pm 5.15$   
(n=7)

Während der 4-stündigen Reaktionszeit wurde in DOC, sowie in EC-Membranen mehr als 98% des Vit.E oxidiert. Bei beiden Oxidationen waren die Muster der gebildeten Produkte ähnlich. Wie schon in Abschnitt 3.2.2. beschrieben, konnte das "16"-Produkt als Tocopherylchinon identifiziert werden.

Die in Abbildung 42 dargestellten Oxidationsprodukte konnten durch Chromatographie in einem stärker polaren Elutionsmittel von 15% Wasser in Methanol besser voneinander getrennt werden (Tab.13). Dabei wurden die früher gefundenen 3 Hauptoxidationsprodukte der EC weiter aufgespalten (Abb.43).

| Elutionssystem         | Retentionszeiten der Oxidationsprodukte |     |                  |
|------------------------|-----------------------------------------|-----|------------------|
|                        | I                                       | II  | Tocopherylchinon |
| 6% Wasser in Methanol  | 6'                                      | 11' | 16'              |
| 15% Wasser in Methanol | 30'                                     | 70' | 100'             |

Tab.13: Retentionszeiten von Vit.E-Oxidationsprodukten der EC-Membranen in zwei verschiedenen polaren HPLC-Elutionssystemen (siehe Tab.5E,F).

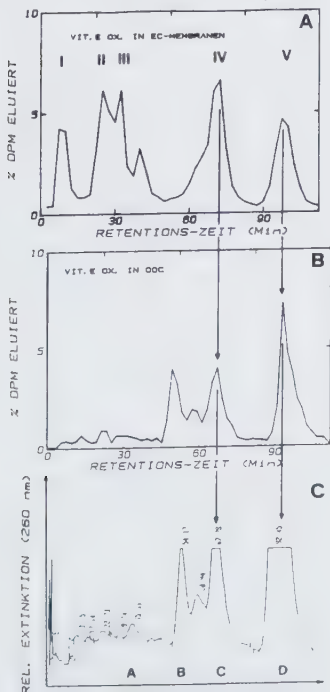


Abb.43: HPLC-Analyse von Vit.E-Oxidationsprodukten, gebildet in EC-Membranen und DOC, durch Oxidation mit dem XOD-System (2.5.1.).  
 Elutionssystem 15% Wasser in Methanol (siehe Tab.5F).  
 % Dpm=Dpm pro Fraktion/Dpm total eluiert.  
 A: Vit.E oxidiert in EC-Membranen  
 B: Vit.E oxidiert in DOC  
 C: HPLC-Chromatogramm der, in DOC gebildeten Oxidationsprodukte

Aus den HPLC-Analysen geht hervor, dass zwei der Hauptoxi-  
dationsprodukte der EC-Membranen (Produkt II und Tocophe-  
rylchinon) auch in DOC gebildet werden. Das Muster der ge-  
bildeten Oxidationsprodukte in EC-Membranen und in DOC ist  
aber nicht identisch. Die Oxidation in DOC stellt jedoch  
ein einfaches System zur quantitativen Herstellung eines  
Teils der Oxidationsprodukte dar, die auch in der Zellmem-  
bran gebildet werden.

Die Stabilität der einzelnen Oxidationsprodukte der EC-  
Membranen wurde überprüft. Die Produkte I-V wurden dazu  
isoliert, rechromatographiert, und in 2-Propanol gelöst  
nach 2 wöchiger Lagerung bei 4°C erneut rechromatogra-  
phiert. Die HPLC-Elutionsprofile der gelagerten isolierten  
Produkte sind im unteren Teil der Abbildung 44 dargestellt.

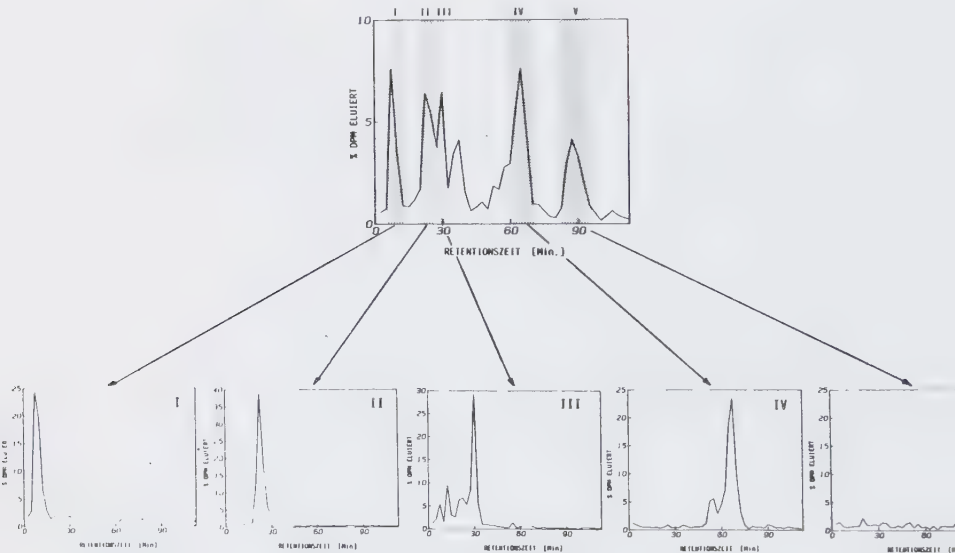


Abb.44: Stabilität der isolierten Vit.E-Oxidationsprodukte.  
Oxidation: In EC-Membranen mit dem XOD-System (2.5.1.)  
Lagerung: 2 Wochen bei 4°C in 2-Propanol  
HPLC-Bedingungen: Tab.5F  
% DPM = Dpm pro Fraktion / Dpm total eluiert

Aus Abbildung 44 ist ersichtlich, dass die Oxidationsprodukte I, II und V in 2-Propanol stabil, die Produkte III und IV hingegen instabil waren. Aus Produkt IV bildete sich ein Produkt grösserer Polarität, dessen Retentionszeit von 53 Min. mit dem in DOC gebildeten Produkt B (Abb.43 C) übereinstimmt.

### 3.5.3. Herstellung von Membranoxidationsprodukten mit in Deoxycholat solubilisiertem Vit.E.

Diese Versuche hatten zum Ziel, Oxidationsprodukte der EC-Membranen im einfachen DOC-System quantitativ herzustellen, zu isolieren, zu charakterisieren und zu identifizieren.

#### 3.5.3.1. Kinetik der Oxidationsproduktbildung in Deoxycholat

Vit.E solubilisiert mit 0.2% DOC in physiologischem Na-P-Puffer, pH 7.4 wurde mit dem XOD-System oxidiert (siehe 2.5.1) (Abb.23).

Nach einer 10-minütigen Reaktionszeit tauchte auf dem Chromatogramm ein erstes Oxidationsprodukt (D) mit einer Retentionszeit von 107 Minuten auf. Es handelte sich dabei um Tocopherylchinon. Nach 30 Min. wurde ein zweites Hauptprodukt (C, Retentionszeit 78 Min.) bestimmbar, daneben wurden in kleinen Mengen auch Oxidationsprodukte mit der Retentionszeit von 37 (A) und 60 (B) Minuten gebildet. Im weiteren Verlauf der Oxidation bildeten sich neben diesen 4 Produkten A,B,C und D mit den Retentionszeiten 37, 60, 78 und 107 Minuten keine neuen Produkte. Das Verhältnis der einzelnen Produkte zueinander änderte sich mit zunehmender Reaktionsdauer.

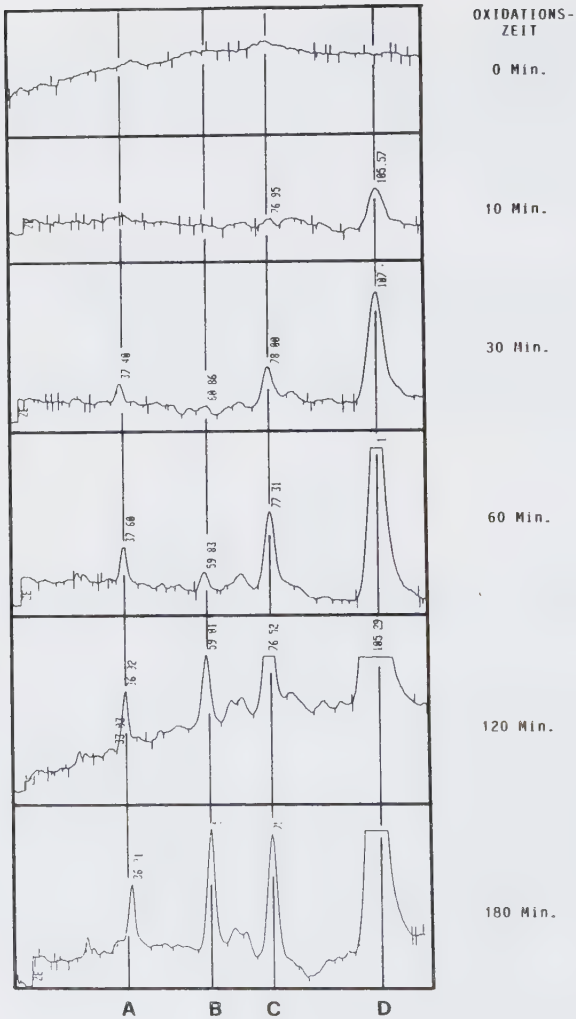


Abb.45: Kinetik der Bildung von Vit.E-Oxidationsprodukten in DOC.  
Oxidation: 2  $\mu$ Mol Vit.E in 0.2 % DOC mit XOD-System (siehe 2.5.1).  
HPLC-Bedingungen: Tab.5F

Tocopherylchinon (D) und das Produkt A wurden kontinuierlich gebildet, die beiden anderen Produkte jedoch nicht. Die Darstellung der relativen Mengen der Produkte B und C bezogen auf Tocopherylchinon (D) im Verlauf der Oxidation (Abb.46) zeigt die Möglichkeit, dass Produkt B während der Oxidation aus Produkt C gebildet wird.

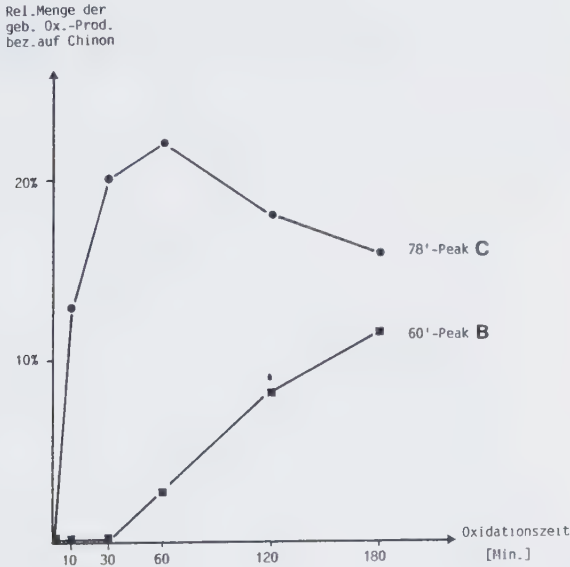


Abb.46: Darstellung der relativen Mengen der Oxidationsprodukte B(60') und C(78') (Vergleiche Abb.45), bezogen auf Tocopherylchinon (D).

Die Oxidationsprodukte A(37'), C(78') und D(105') werden somit unabhängig voneinander gebildet. Das Produkt B (60') hingegen entsteht aus Produkt C und wird nach 30Min. nachweisbar.

### 3.5.3.2. Isolierung der Oxidationsprodukte

Die, in DOC gebildeten Oxidationsprodukte wurden zur spektroskopischen Charakterisierung semiquantitativ hergestellt (2.5.1.).

Die Oxidationsprodukte wurden auf der semipräparativen HPLC-Säule (2.0 x 25cm) mit 15% Methanol in Wasser als Elutionsmittel aufgetrennt (Tab.5G) und unter Stickstoff zur Trockenheit eingengt. Die einzelnen Proben wurden in 2-Propanol aufgelöst und zur Ueberprüfung des Reinheitsgrades rechromatographiert. Aus Abbildung 47 ist ersichtlich, dass die 4 Produkte vollständig voneinander getrennt werden konnten und während der Aufarbeitung unter Stickstoff stabil blieben.

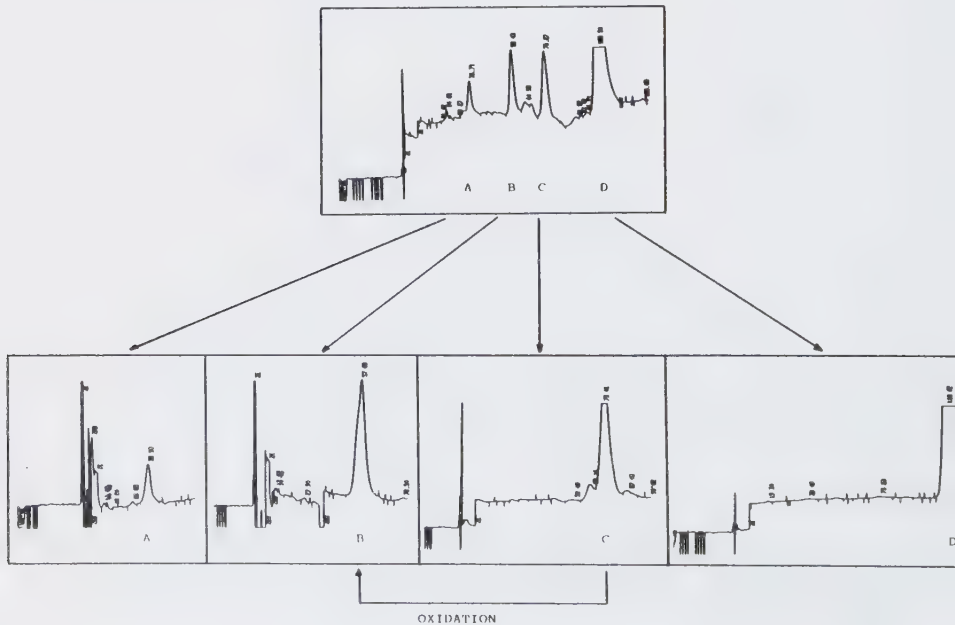


Abb.47: HPLC-Analyse und Rechromatographie der, in DOC gebildeten, Vit.E-Oxidationsprodukte.

Oxidation: Vit.E in 0.2% DOC mit dem XOD-System (siehe 2.5.1.)

HPLC-Bedingungen: Tab.5G

Die gereinigten Produkte C(78') und D(105') (Abb.47) wurden unter Stickstoff wieder eingengt und in 0.2% DOC in NaCl-Tris-Puffer erneut dem XOD-System ausgesetzt (siehe 2.5.1.) und mit HPLC analysiert (Tab.5F).

Tocopherylchinon (D) änderte dabei seine chromatographischen Eigenschaften nicht (Daten nicht gezeigt), woraus geschlossen wird, dass Tocopherylchinon nicht mehr weiter oxidiert werden kann. Produkt C konnte jedoch schrittweise zu Produkt B oxidiert werden (Abb.48).

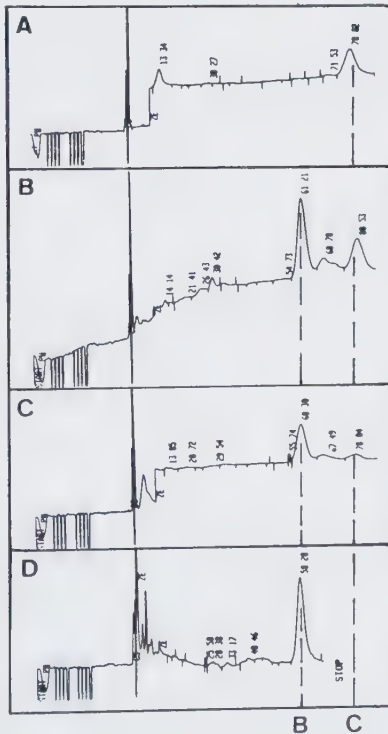


Abb.48: Oxidation von Produkt C mit dem XOD-System.  
A: Ausgangsmaterial: Produkt C (Abb.47)  
B: Oxidation von Produkt C, gelöst in 0.2% DOC, mit dem XOD-System (siehe 2.5.1).  
C: Erneute Oxidation des, in Abb.48B hergestellten Oxidationsprodukt C. (Oxidation in 0.2% DOC mit dem XOD-System)  
D: Reines Endprodukt: Entspricht Produkt B aus Abb.47

### 3.5.3.3. Spektroskopische Charakterisierung der Oxidationsprodukte

#### Absorptionsspektroskopie

Von den, in Abschnitt 3.5.3.2. beschriebenen und isolierten Oxidationsprodukten (Abb.47:B,C und D) wurden Absorptionsspektren aufgenommen (siehe 2.11.1). Die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Oxidationsprodukte wurden aus den Absorptionsspektren unter Verwendung der bekannten spez.Aktivitäten der Produkte, die durch Oxidation von  $^3\text{H}$ -markiertem Vit.E gewonnen wurden, berechnet (Abb.49).

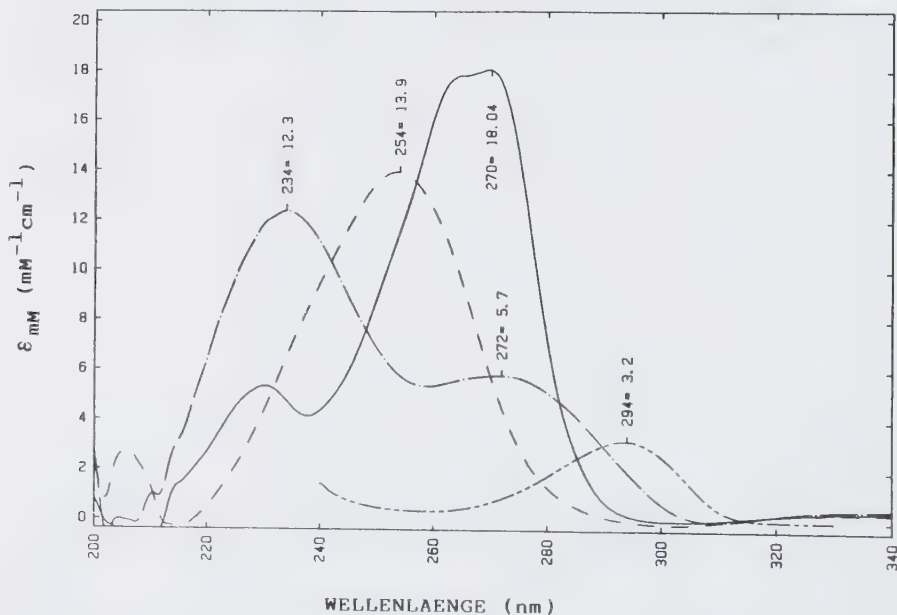


Abb.49: Absorptionsspektren von Vit.E (---) und den in DOC gebildeten Oxidationsprodukten B(---), C(-.-) und D(—) aufgenommen in Aethanol (siehe 2.11.1.).

Oxidationsprodukt D konnte aufgrund seines charakteristischen Absorptionsspektrums ( $\lambda_{\text{max}} = 268 \text{ nm}$ ) und seiner, durch Vergleich mit Tocopherylchinonreinsubstanz bestimmten, charakteristischen Retentionszeit auf HPLC als Tocopherylchinon identifiziert werden. Oxidationsprodukt C, das auch zu den Hauptoxidationsprodukten der EC-Membranen gehört (Abb.43), wurde spektroskopisch weiter untersucht.

## Massenspektrometrie

Von Tocopherylchinon und dem Oxidationsprodukt C wurden Massenspektren aufgenommen (Abb.50).

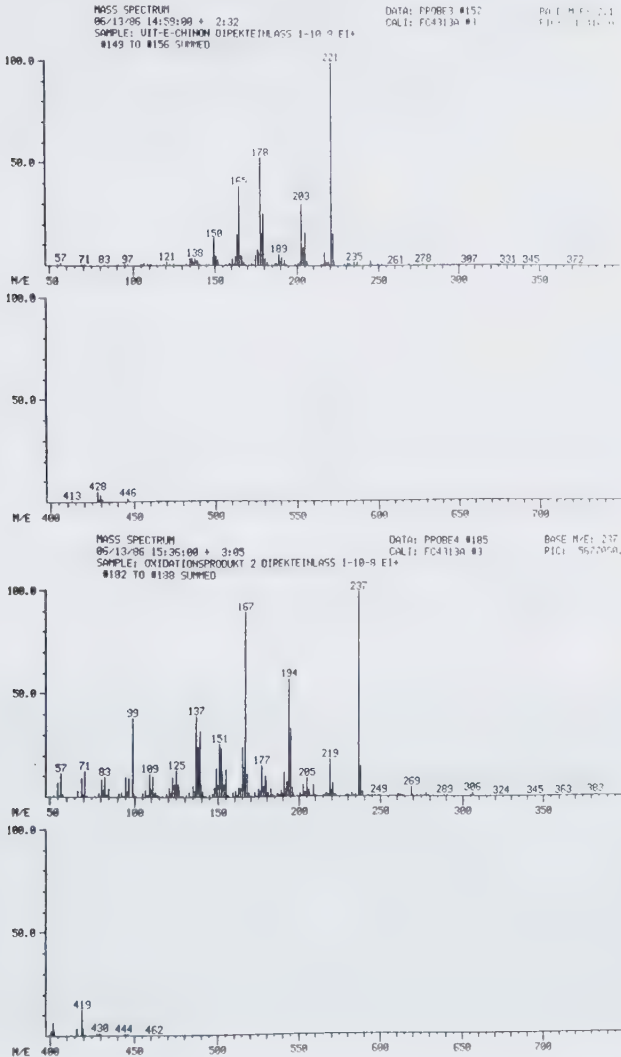


Abb.50: Massenspektren von Tocopherylchinon (I) und Oxidationsprodukt C (II) (siehe 2.11.4.). Y-Achse: relative %, x-Achse: m/e =Ionenmasse/Ionenladung=Dalton  
Molekül-Ionen: Tocopherylchinon: 446  
Oxidationsprodukt C: 462

Der Vergleich der Fragmentierungsmuster dieser beiden Oxidationsprodukte zeigt, dass bei beiden Molekülen die Phytolkette (Masse=225) abgespalten wurde, was zu Fragmenten mit der Masse 221 bzw. 237 führte. Daraus kann geschlossen werden, dass die Seitenkette bei der Oxidation unverändert blieb. Zudem unterschieden sich die einzelnen Hauptspaltprodukte von Tocopherylchinon um eine Masse von 16 von Oxidationsprodukt C (Tab.14).

| Massenfragmente von<br>Tocopherylchinon | Massenfragmente von<br>Oxidationsprodukt C | Differenz |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------|-----------|
| 150                                     | 167                                        | 17        |
| 165                                     | 180                                        | 15        |
| 178                                     | 194                                        | 16        |
| 203                                     | 219                                        | 16        |
| 221) *                                  | 237) *                                     | 16        |
| 413                                     | 429                                        | 16        |
| 428                                     | 444                                        | 16        |
| 446) *                                  | 462) *                                     | 16        |

Tab.14: Vergleich der Fragmentierungsmuster von Tocopherylchinon und Oxidationsprodukt C.  
(\* = Abspaltung der Masse 18)

Tabelle 14 zeigt, dass sich alle Hauptfragmente von Tocopherylchinon und Oxidationsprodukt C um die Masse 16 unterscheiden, was unter Berücksichtigung der Reaktionsbedingungen auf Sauerstoffeinlagerung in das Chinonmolekül hinweist. Bei beiden Oxidationsprodukten konnte zudem zwischen entsprechenden Fragmenten die Abspaltung der Masse 18 beobachtet werden, was auf Wasserabspaltung in den Oxidationsprodukten schliessen lässt.

Einlagerung von Sauerstoff in Tocopherylchinon liess vermuten, dass es sich bei dem gesuchten Oxidationsprodukt C um eine der, in Abbildung 51 dargestellten, Epoxidstrukturen handeln könnte.

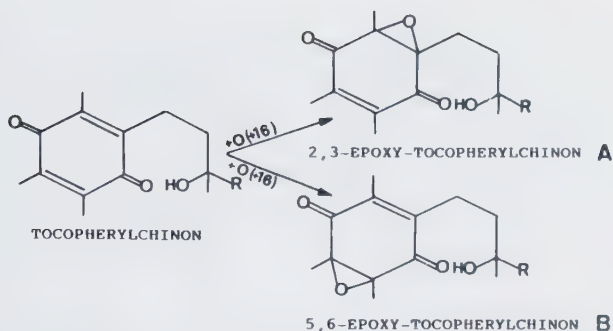


Abb.51: Epoxid-Bildung durch Einlagerung von Sauerstoff in Tocopherylchinon.

Zur Ueberprüfung dieses Befundes wurden Infrarot und Protonen NMR-Spektren aufgenommen und mit den für 2,3-Epoxy-Tocopherylchinon beschriebenen Daten [85] verglichen.

### Infrarot-Spektroskopie

Durch Aufnahme eines Infrarotspektrums des Oxidationsproduktes C (Abb.52) konnte folgende Uebereinstimmung mit Literaturdaten gefunden werden (Tab.15).

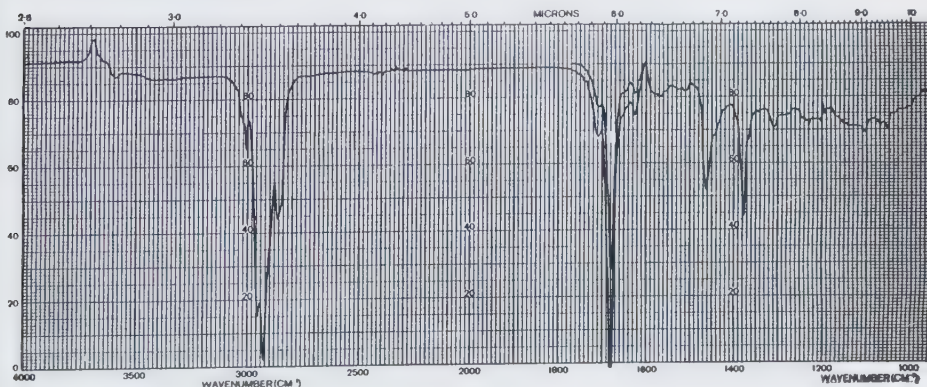


Abb.52: Infrarot-Spektrum von Oxidationsprodukt C aufgenommen in Chloroform (2.11.3.).

| 2,3-Epoxy-Tocopherylchinon [85]<br>( $\text{cm}^{-1}$ )  | Oxidations-<br>produkt C<br>( $\text{cm}^{-1}$ )                | Charakter-<br>istische<br>Schwingung                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3500<br>2950<br>2780<br>1680<br>1635 (w)<br>1465<br>1380 | keine Bande<br>2950<br>2840<br>1680<br>1635 (w)<br>1465<br>1380 | OH<br>CH <sub>3</sub><br>CH <sub>3</sub> ,CH <sub>2</sub><br>C=O(Chinon)<br>C=C Konj.mit C=O<br>CH <sub>3</sub> ,C-H<br>CH <sub>3</sub> |

Tab.15: Vergleich der Wellenzahlen von Oxidationsprodukt C (in  $\text{CHCl}_3$ ) mit denen für 2,3-Epoxy-Tocopherylchinon [85] (in  $\text{CCl}_4$ ). (w = schwach)

Im Infrarot-Spektrum stimmten bis auf die Hydroxylbande bei  $3500\text{ cm}^{-1}$  praktisch alle Banden überein. Der Unterschied der C-H-Schwingung (2780,2840) könnte auch durch die verschiedenen Lösungsmittel bedingt sein. Im Infrarot-Spektrum wurden aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Verbindung A und B aus Abbildung 51 keine spektroskopische Unterschiede erwartet.

### Protonen NMR-Spektroskopie

Von Oxidationsprodukt C wurde ein Protonen-NMR-Spektrum aufgenommen und dessen chemische Verschiebungen mit den Literaturwerten [85] verglichen (Tab.16).

| 2,3-Epoxy-Tocopherylchinon [85]<br>$\delta$ (ppm) | Interpre-<br>tation                           | Oxidations-<br>produkt C<br>$\delta$ (ppm) |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 0.8-0.9                                           | m,12H,4CH <sub>3</sub>                        | 0.8-0.9                                    |
| 1.0-1.66                                          | m,28H,11CH <sub>2</sub> ,3CH,1CH <sub>3</sub> | 1.0-1.66                                   |
| 1.55                                              | s,3H,CH <sub>3</sub> ;1H,-OH)                 | 1.55(CH <sub>3</sub> ),1.62(-OH)           |
| 1.92                                              | s,6H,2vinyl,CH <sub>3</sub>                   | 1.96                                       |

Tab.16: Vergleich der chemischen Verschiebungen ( $\delta$ ) von Oxidationsprodukt C (in  $\text{CHCl}_3$ ) und 2,3-Epoxy-Tocopherylchinon (in  $\text{CCl}_4$ ) [85] im  $^1\text{H}$ -NMR (m = mittel, s = stark).

Im Protonen-NMR stimmten praktisch alle gefundenen chemischen Verschiebungen mit der postulierten Epoxidstruktur A in Abbildung 51 überein. Einziger Unterschied bestand in der Verschiebung der Hydroxylgruppe auf 1.62, die durch das unterschiedliche Lösungsmittel ( $\text{CHCl}_3$  anstelle von  $\text{CCl}_4$ ) bedingt sein könnte. Die Integralverhältnisse stimmten jedoch nicht für eine einzige Verbindung. Da man für Verbindung A und B (Abb.51) annehmen kann, dass die  $\text{CH}_2$ - und  $\text{CH}_3$ -Gruppen der Seitenkette aufeinanderfallen, diejenigen im Ring jedoch nicht, erklärt sich das falsche Integralverhältnis.

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren weisen also darauf hin, dass ein Gemisch der Verbindung A und B (Abb.51), das mit der semipräparativen HPLC-Säule mit dem verwendeten Elutionssystem nicht getrennt werden konnte, isoliert wurde.

Für 2,3-Epoxy-Tocopherylchinon wurde ein Absorptionsmaximum von 272 nm (in Hexan) und ein Extinktionskoeffizient von  $4.05 \times 10^3$  angegeben. Vergleicht man diese Werte mit denen von Abb.49 so ist ersichtlich, dass zusätzlich ein zweites Maximum bei 234 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von  $12.3 \times 10^3$  gemessen wurde.

Die Beiden in Abbildung 51 gezeigten Epoxide stehen aber in Lösung im Gleichgewicht mit ihren Halbacetalformen (Abb.53).

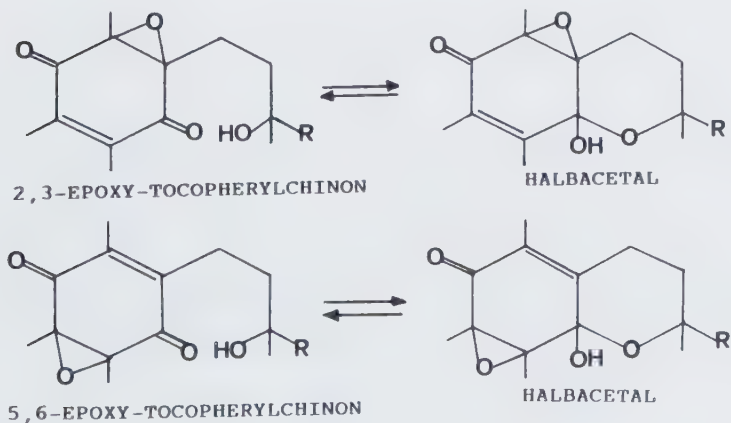


Abb.53: Halbacetalbildung bei den beschriebenen Epoxiden

Diese Halbacetalbildung führt zu einer Abnahme der Konjugation der Elektronen und damit zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums in den kürzerwelligen Bereich. In der Literatur wurde für solche Enone in Aethanol ein Absorptionsmaximum von 230-240nm bestimmt [109].

Zusammenfassend handelt es sich bei dem Oxidationsprodukt C mit sehr grosser Wahrscheinlichkeit um ein Gemisch der in Abbildung 53 dargestellten Chinonepoxide, die im Gleichgewicht mit ihren Halbacetalformen liegen.

### 3.6. Stabilität der Oxidationsprodukte in intakten Erythrocyten

Mit diesen Versuchen wurde geprüft, ob die in DOC hergestellten Oxidationsprodukte C und D, die auch in EC-Membranen gebildet werden, in intakten EC stabil sind oder mit den natürlichen, in Plasma und EC vorhandenen Reduktionssystemen zu Vit.E reduziert werden können.

0.5  $\mu$ Mol  $^3$ H-Vit.E (Spez.Akt.: 7.5  $\mu$ Ci/ $\mu$ Mol) in 5 ml 0.2 % DOC wurden mit dem XOD-System oxidiert (2.5.1.) und mit HPLC semipräparativ, wie in 2.5.3.2. beschrieben, isoliert (Tab.5G). 91 % des eingesetzten Vit.E konnte oxidiert werden.

#### 3.6.1. Einbau der Oxidationsprodukte in Erythrocyten

Die Oxidationsprodukte C und D (siehe Abb.47) wurden unter Stickstoff eingeengt und durch Addition von je 2 ml frischem Plasma, kombiniert mit leichtem Schütteln während 4 Stunden bei 37°C in Stickstoff, an Trägerproteine gebunden. Die Lösung wurde anschliessend in ein neues Glas transferiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. 60% der Produkte C und D wurden durch diesen Vorgang an Plasmaproteine gebunden. Das mit Oxidationsprodukten beladene Plasma wurde anschliessend zu gewaschenen und gepackten EC gegeben (HK ca.40) und in Gegenwart von 10 mM Glucose inkubiert (37°C, 95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>). In 8-stündiger Inkubationszeit wurden 10% von Produkt C und 14 % von Produkt D von Plasmaproteinen auf EC-Membranen übertragen.

### 3.6.2. Untersuchung der Stabilität der Oxidationsprodukte in der Erythrocytenmembran.

Nach 4, 8 und 24 Stunden wurden Proben entnommen. Die EC wurden durch Zentrifugation vom Plasma separiert und drei Mal mit NaCl-Tris-Puffer, pH 7.4 gewaschen. Nach dem dritten Waschvorgang waren die Ueberstände praktisch radioaktivitätsfrei (1% der eingesetzten Radioaktivität), was zeigt, dass die membrangebundenen Oxidationsprodukte durch Waschen in physiologischem Puffer nicht entfernt werden konnten. Die Oxidationsprodukte des Plasmas und der Erythrocyten wurden anschliessend extrahiert (siehe 2.3.1, 2.3.2) und mit HPLC (Tab.5E) analysiert (Abb.54).

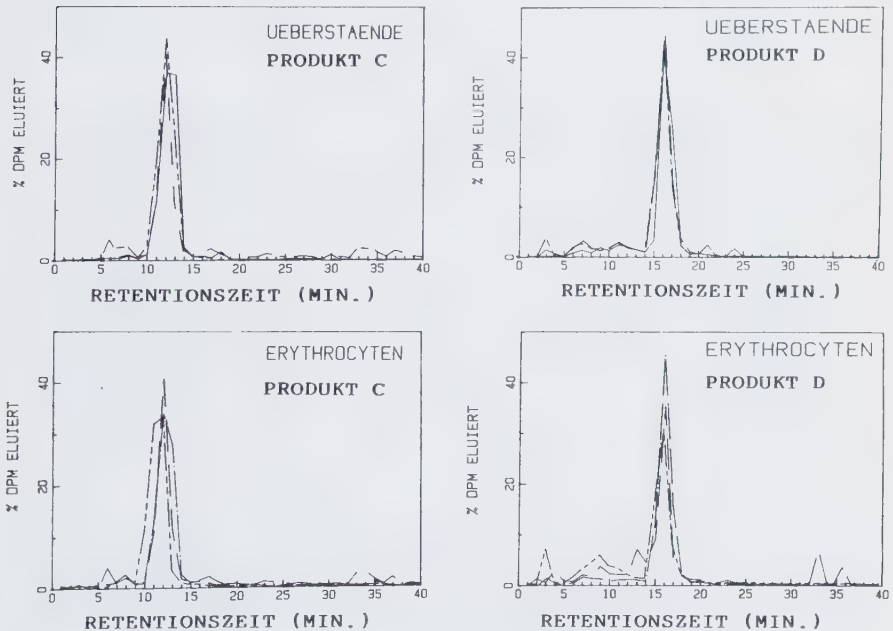


Abb.54: Stabilität der Oxidationsprodukte C und D in Plasma (Ueberstände) und EC.

HPLC-Analysen der Oxidationsprodukte in Plasma und EC nach 0 (—), 4 (---), 8 (— · —) und 24 (— · —) stündiger Inkubationszeit.

HPLC-Bedingungen (siehe Tab.5E)

% Dpm = Dpm pro Fraktion / Dpm total eluiert

Die Verteilung der Radioaktivität in den Inkubationsüberständen (Oxidationsprodukte lipoprotein- und serumalbumin-gebunden) und in den EC (Oxidationsprodukte membrangebunden) zeigt, dass die Produkte sowohl plasmaprotein- als auch EC-Membran-gebunden während der 24-stündigen Reaktionszeit stabil blieben. Aus dem Fehlen von Radioaktivität im Bereich der für Vit.E erwarteten Retentionszeit (27') kann geschlossen werden, dass während der Inkubation der Oxidationsprodukte kein Vit.E zurückgebildet wurde (Nachweisgrenze 0.1% der eingesetzten Radioaktivität). Die Oxidationsprodukte können somit nicht in Vit.E zurückreduziert werden, was bedeutet, dass unter diesen experimentellen Bedingungen kein Recycling von Vit.E im Plasma oder in der EC-Membran existiert.

### 3.6.3. Stimulation der Reduktion von Vit.E-Oxidationsprodukten mit Vit.C und Methylenblau.

Vit.E-Oxidationsprodukte wurden wie in den Abschnitten 3.6., 3.6.1. beschrieben hergestellt und an Plasmaproteine gebunden. Gewaschene und gepackte EC wurden zum Plasma addiert (HK ca.40) und darin inkubiert (37°C, 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 10mM Glucose).

Nach einer zweistündigen Inkubationsszeit wurden Proben entnommen und die Oxidationsprodukte in den Ueberständen und EC bestimmt. Die Inkubationsansätze wurden anschließend mit Methylenblau (Endkonzentration 50 µM) oder Vit.C (Endkonzentration 10 mM) versetzt. Die Ansätze wurden erneut inkubiert und nach weiteren 2 Stunden (Totale Reaktionszeit=4 Stunden), 6 Stunden (=8 Stunden) und 22 Stunden (=24 Stunden) wurden Proben entnommen, deren Lipide extrahiert und chromatographiert.

Die HPLC-Chromatogramme der beiden Oxidationsprodukte C und D im Ueberstand und in den EC-Membranen veränderten sich durch die Zugabe der Reduktionsmittel Methylenblau bzw. Vit.C nicht und unterschieden sich auch nicht von den in Abschnitt 3.6.2. gezeigten Abbildung 54.

Trotz Zufügen eines biologischen Reduktionsmittels (Vit.C) oder einer Stimulation der NADPH<sub>2</sub>-Produktion durch Methylenblau konnte keine Reduktion der künstlich in EC-Membranen eingebauten Vit.E-Oxidationsprodukte beobachtet werden. Die Oxidationsprodukte blieben in beiden Fällen stabil.

## 4. DISKUSSION

=====

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel die Oxidation von Vit.E unter physiologischen Bedingungen, wenn möglich in biologischen Systemen in situ zu untersuchen.

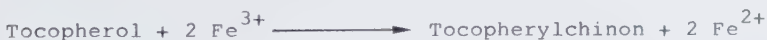
Ausgangspunkt der Arbeit sind die bekannten Oxidationsvorgänge an Tocopherol, die - dem lipophilen Charakter des Vitamins entsprechend - in organischen Lösungsmitteln untersucht wurden. Je nach Bedingungen und Oxidationsmittel wurden verschiedene Oxidationsprodukte gefunden (Abb.16), die alle aus einer 2-Elektronen-Übertragung, bei der als gemeinsames Zwischenprodukt ein Chromanoxylradikal gebildet wird, stammen. Zur Lösung der gestellten Probleme musste zunächst das organische Lösungsmittel durch ein wässriges System ersetzt werden, was wie später gezeigt auch eine Änderung der Oxidationsmittel mit sich brachte.

### 4.1. Suche nach Vit.E-Oxidationssystemen in wässrigen Lösungen

#### 4.1.1. Oxidation mit Metallsalzen

Zunächst wurden einfache durch Schwermetall-Ionen vermittelte Oxidationen untersucht, welche summarisch die folgenden Resultate ergaben:

Durch Oxidation in 75%-iger äthanolischer Lösung mit  $\text{FeCl}_3$  konnte Vit.E vollständig zu Tocopherylchinon oxidiert werden (Abb.24). Dabei wurde die in Abbildung 3 beschriebene Stöchiometrie der Reaktion gefunden:



$\text{Fe}^{3+}$ -Ionen bilden in wässrigen Lösungen das schwerlösliche Eisenhydroxid ( $\text{Lp}=10^{-38}$ ), deshalb ist dieses Oxidationssystem zur Reaktion unter neutralen Bedingungen ungeeignet.  $\text{Cu}^{2+}$  weist gegenüber  $\text{Fe}^{3+}$  eine bessere Wasserlöslichkeit in neutraler Lösung auf ( $\text{Lp}=10^{-20}$ ), andererseits fanden wir, dass bei der Oxidation von Vit.E mit  $\text{CuSO}_4$  in 10%-iger äthanolischer Lösung wenig Tocopherylchinon, dafür aber ein neues, weniger polares Oxidationsprodukt gebildet wurde (Abb.27,28). Vergleichsoxidationen in äthanolfreien Lösungen (Abb.29,30) und die verminderte Polarität des Produktes, das aufgrund seiner HPLC-Retentionszeit als "15'-Produkt" bezeichnet wurde, liessen erkennen, dass es sich hier um eine in der Literatur [74,84,112] ebenfalls beschriebene Bildung des Alkoholadduktes 9-Aethoxy-Tocopheron (Abb.55) handelt.

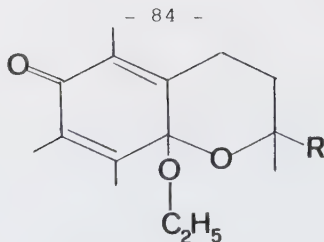


Abb.55: Bildung von 9-Aethoxy-Tocopheron durch  $\text{Cu}^{2+}$ -Oxidation in äthanolischer Lösung.

Diese Erkenntnis - obschon nicht weiterführend - ist von besonderer Bedeutung, da für Experimente mit dem wasserunlöslichen Tocopherol die Verwendung von verdünnter äthanolischer Lösung naheliegt, jedoch - wie beschrieben - zu Artefakten führen kann. In der Literatur stiessen wir auf eine Arbeit [76], die diesem Umstand keine Rechnung trug und ein neues Oxidationsprodukt beschrieb, das mit hoher Wahrscheinlichkeit ein derartiges Alkoholaddukt ist. Dieser Befund führte dazu, dass ein Solubilisierungsverfahren für Vit.E gesucht werden musste.

Der Vergleich der beiden Oxidationsmittel  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  in Anwesenheit von Aethanol zeigt, dass das durch  $\text{Cu}^{2+}$  gebildete Alkoholaddukt mit  $\text{Fe}^{3+}$  nicht gebildet wird. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass aufgrund des im Vergleich zu  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{1+}$  (0.17 V) höheren Redoxpotential von  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  (0.75 V) Aethanol zu Acetaldehyd oxidiert wird, während bei der Cu-Oxidation wahrscheinlich durch 1-Elektronen-Oxidation ein Aethanol-Radikal gebildet wird, das in einer Konkurrenz-Reaktion an das Chromanoxylradikal addiert werden kann.

Aufgrund der ungenügenden Löslichkeit von  $\text{FeCl}_3$  in neutralen Lösungen und der unvollständigen Oxidation mit  $\text{CuSO}_4$  wurde weiter nach einem System zur schonenden Oxidation von Vit.E in wässrigen Lösungen gesucht, um möglichst physiologische Oxidationsprodukte zu bilden.

#### 4.1.2. Oxidation mit XOD-System

Der Ersatz des organischen Lösungsmittel durch Solubilisierung von Vit.E in DOC ermöglichte eine Oxidation unter physiologischen Bedingungen (verdünnte wässrige Lösung, neutrales pH). Zur Oxidation wurde die kontinuierliche, enzymatische Produktion von Wasserstoffperoxid und Superoxidationradikalen und anschliessender Hydroxylradikalproduktion in der Haber-Weiss-Reaktion (Abb.7) angewandt. Dieses System erlaubt eine Oxidation von Vit.E unter Bedingungen, die auch in lebenden Zellen auftreten können, da als Nebenprodukte verschiedener Stoffwechselreaktionen die gleichen, partiell reduzierten Sauerstoffmoleküle gebildet werden können ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Wie in Abschnitt 3.2.2. gezeigt, erfolgt durch Einwirkung des XOD-Systems auf in DOC solubilisiertes Vit.E eine vollständige Oxidation zu verschiedenen Produkten, wobei eines der Hauptoxidaionsprodukte wiederum Tocopherylchinon ist.

Die drei beschriebenen Systeme wurden zur Untersuchung der Vit.E-Oxidation in seiner biologischen Umgebung (zum Bsp.in EC-Membranen) und in Modell-Umgebungen (Proteingebunden, in Micellen solubilisiert mit DOC) herangezogen.

#### 4.2. Anwendung der 3 Systeme auf EC und EC-Membranen

Intakte EC wurden den drei beschriebenen Oxidationssystemen ausgesetzt. Die Tatsache, dass Vit.E dabei mit keinem der Oxidationssysteme ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , XOD-System) oxidiert werden konnte (Abschnitt 3.3.2.) und dass Met-Hb gebildet wurde, wird im folgenden Abschnitt diskutiert und führte dazu, anstelle der intakten Zellen isolierte EC-Membranen zu untersuchen.

EC-Membranen wurden mit einer Methode (2.6.1.) hergestellt, bei der weder Membranprotein- noch Membranlipid-Verluste auftreten. Die EC-Membranen wurden durch Ueberführen in isotonischen Puffer zu EC-Ghosts verschlossen.

Die Oxidation von EC-Membranen ergab mit allen drei Oxidationsmitteln eine Vit.E-Abnahme (Abb.33). Der Vergleich der drei Oxidationsmittel zeigt, dass das XOD-System eine rasche ( 4 Stunden) und vollständige Oxidation von Vit.E bewirkt, während die Metallsalze unvollständig oxidieren, obschon sie im Ueberschuss vorhanden waren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Oxidation von Vit.E nur in EC-Membranen und nicht an intakten EC durchgeführt werden kann. Die unterschiedliche Wirksamkeit der drei Oxidationsmittel führte zu folgenden Schlüssen:

In intakten EC reagieren alle geprüften Oxidantien rascher mit Hb als mit membranengebundenem Vit.E. Der ionische Charakter von  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  erklärt, warum diese Oxidantien besser mit dem im wässrigen Kompartiment vorliegenden und leicht oxidierbaren Hb reagieren als mit Vit.E, das sich ausschliesslich im lipophilen Zellwandkompartiment findet. Diese Interpretation wird unterstützt durch kinetische Untersuchungen (Abb.33), die zeigen, dass membrangebundenes Vit.E in Abwesenheit von Hb (EC-Membranen) durch  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  zwar oxidierbar ist, jedoch in geringerem Ausmass als bei Oxidation im XOD-System, welches ungeladene Hydroxylradikale produziert.

In intakten EC vermag jedoch auch das XOD-System kein Vit.E zu oxidieren. Wir nehmen an, dass Wasserstoffperoxid, das ein Zwischenprodukt dieser Reaktion darstellt (Vergleiche Abb.7), durch Hb katalytisch so schnell abgebaut wird, dass keine Reaktion zum Hydroxylradikal, welches die Oxidation von Vit.E vermittelt, auftreten kann (Abb.56). Die Tatsache, dass äquimolare Xanthinabnahmen und Met-Hb-Zunahmen bei Oxidation von intakten EC mit dem XOD-System gemessen wurden (Tab.7) lassen ausschliessen, dass weitere, quantitativ wichtige Oxidationsreaktionen unerkannt ablaufen und weisen ebenfalls auf die obige Erklärung hin.

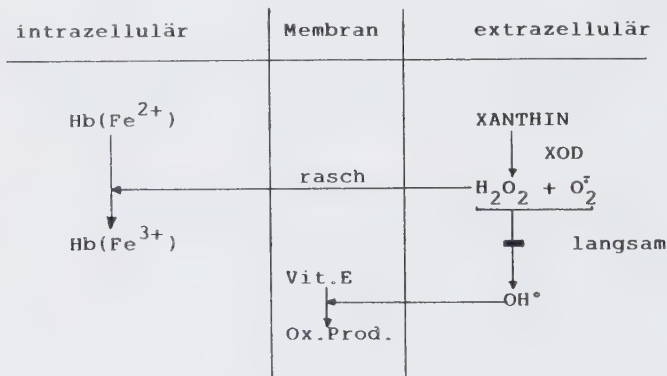


Abb.56: Oxidation von intrazellulärem Hb durch Wasserstoffperoxid des XOD-Systems.

In intakten EC kann Vit.E durch extrazelluläre Radikalproduktion nicht oxidiert werden da bevorzugt Hb als wasserlösliche und oxidative Verbindung reagiert. In einer Arbeit von Niki [68] wurde an Hand von Liposomen ein ähnliches Ergebnis erhalten: Radikale, gebildet in der wässrigen Phase, wurden bei gleichzeitigem Vorhandensein von hydrophilen und lipophilen Oxidantien (eingebaut in Liposome) bevorzugt von hydrophilen Antioxidantien, hingegen Radikale, die in der Lipidschicht der Liposomen gebildet wurden, bevorzugt von lipophilen Antioxidantien wie zum Beispiel Vit.E abgefangen (Vergleiche Abb.11,12). In natürlichen Membranen können Radikale nicht künstlich innerhalb der Lipidmembran erzeugt werden. Die einzige Möglichkeit, Membranen mit Radikalen zu belasten, ist die Entfernung der zusätzlichen hydrophilen antioxidativen Systeme der Zelle (in EC z.Bsp.: Hb, GSH oder die Enzyme SOD, CAT, GPX und PRX ,Vergleiche Abb.9) was durch die Isolierung von EC-Membranen erreicht werden konnte.

Die oxidative Abnahme der Vit.E-Konzentration in den Membranen konnte bestimmt werden. Das neu gebildete Produkt, das durch Chromatographie des Membran-Lipidextraktes auf HPLC erkennbar wurde, konnte jedoch nicht eindeutig als Oxidationsprodukt von Vit.E bestimmt werden, da dessen Eigenschaften zur Identifikation nicht bekannt waren. Aus diesen Gründen drängte sich die Oxidation von markiertem, in EC-Membranen inkorporiertem Vit.E auf. Es musste daher nach einem physiologischen Trägersystem gesucht werden, um Vit.E zu solubilisieren, zu den EC zu transportieren und dort in die Membranen zu inkorporieren.

#### 4.3. Suche nach einem System zur Inkorporation von markiertem Vit.E in EC-Membranen

Bei der Suche eines Systems zur schonenden Uebertragung von Vit.E auf intakte EC wurde darauf geachtet, möglichst physiologische Bedingungen auszuarbeiten. Aus diesen Gründen kam eine Zugabe von Vit.E in organischen Lösungsmitteln nicht in Betracht. Vit.E kann als Lipidfilm an eine Glasoberfläche gebunden, aber nicht in physiologischem Puffer dispergiert werden. DOC, ein Detergens, ist sehr geeignet zur Solubilisierung von Vit.E in physiologischem Puffer, jedoch unbrauchbar zur Uebertragung von Vit.E auf intakte Zellen, da durch DOC auch Membranlipide solubilisiert werden, was zu einer Lyse führt.

Im menschlichen Plasma werden verschiedene lipophile Substanzen (z.Bsp. Bilirubin, Fettsäuren etc.) unter anderem an SA gebunden transportiert [104]. Da dieses Protein sehr stabil und einfach erhältlich ist, wurde seine Fähigkeit als Träger von Vit.E in wässriger Lösung untersucht. Wie Kapitel 3.1. zeigt, bindet Vit.E durch Entfernen des organischen Lösungsmittels an die entsprechende Gefäßoberfläche (Glas) und konnte durch SA von der Glasoberfläche entfernt werden. Durch Gelfiltration konnte gezeigt werden, dass dabei eine Bindung des Vit.E an SA erfolgte (Daten nicht gezeigt). Inkubation von intakten EC mit dem gebundenen Vit.E führte zu einer Uebertragung des Vit.E auf die EC. Bei dieser SA-vermittelten Uebertragung von Vit.E war die Entfernung von nicht proteingebundenem Vit.E wichtig, da zur Beurteilung von Oxidationsprodukten ein einheitliches Ausgangsmaterial gefordert werden muss. Diese Bedingung wurde erfüllt durch Inkubation von frisch beladenem Serumalbumin in einem neuen Glasgefäß wodurch allfällige Spuren von nicht gebundenem Vit.E von der Vit.E-freien Glasoberfläche adsorbiert wurden (Abb.23).

Durch Inkubation verschiedener Vit.E-Mengen mit einer SA-Lösung (0.6 mM, entsprechend der Konzentration im menschlichen Plasma) konnten unterschiedliche Konzentrationen an gebundenem Vit.E erreicht werden und durch anschließende Inkubation mit EC konnte deren Uebertragung auf die Zellmembran studiert werden (Abb.37). Mit den eingesetzten Mengen von SA-gebundenem Vit.E konnte keine Sättigung der EC-Membran erreicht werden. Mit der beschriebenen Technik konnte in intakten EC das 100-fache der natürlichen Vit.E-Konzentration (5  $\mu$ M) eingebaut werden. In vivo konnten in menschlichen EC durch Vit.E-Verabreichung die 10-fache Menge des natürlichen Vit.E erreicht werden [91].

Wie in der Einleitung dargestellt, gibt es zwei Möglichkeiten für den Einbau von Vit.E in die Zellmembran. Es wurde die unspezifische Einlagerung von Vit.E in die Lipiddoppelschicht beschrieben [12,13], wenige Autoren postulierten aber ein Vit.E-Rezeptor-Protein in EC-Membranen.

Kitabchi et al.[15-18] konnten Vit.E-Bindungsproteine in EC nachweisen und fanden 160'000 Vit.E-Bindungsstellen pro Zelle. Durch Vergleich der Anzahl Bindungsstellen mit der Anzahl Vit.E-Molekülen pro Liter gepackte EC ist ersichtlich, dass nur ca.50% des membrangebundenen Vit.E durch die von Kitabchi postulierte Bindungsprotein-Theorie erklärt werden kann. Die hohen EC-Vit.E-Konzentrationen, die in vivo durch pharmakologische Dosen von Vit.E erzielt werden können, zeigen umso deutlicher, dass ein Grossteil des membrangebundenen Vit.E nicht durch den postulierten Rezeptor gebunden sein kann, sondern viel wahrscheinlicher im Lipidkompartiment eingelagert ist.

Die von Kitabchi isolierten Vit.E-Bindungsproteine wiesen Molekulargewichte von 65'000 bzw. 125'000 Dalton auf und es wurde ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht postuliert. Auf Grund der Molekulargewichte könnte es sich bei diesen Proteinen durchaus um membranassoziiertes SA handeln, das ein Molekulargewicht von 68'000 Dalton aufweist und ebenfalls zu Dimeren aggregiert.

SA hat sich in vitro als ausgezeichneter Ueberträger von Vit.E erwiesen, obschon es in vivo keine Transportfunktion für Vit.E besitzt [11]. Vit.E wird im Plasma an Lipoproteine gebunden transportiert, weshalb die Uebertragung von Lipoproteingebundenem Vit.E auf EC untersucht wurde.

#### 4.4. Transport von Vit.E im Plasma und dessen Uebertragung auf Erythrocyten.

Lipoproteine besitzen einen aus Triglyceriden, Cholesterin und Cholesterinester bestehenden apolaren Kern und eine aus Proteinen, Phospholipiden und freiem Cholesterin bestehende Hülle [108].

Zur Untersuchung der Beiträge der verschiedenen Lipoproteine an der Vit.E-Uebertragung auf EC wurden Versuche mit markiertem Vit.E durchgeführt.

Tierversuche zeigten, dass die in vitro Beladung von Lipoproteinen mit markiertem Vit.E dem in vivo Einbau gleichzusetzen ist [110], dass aber die erreichte Menge des in vitro gebundenen Vit.E ungefähr 10 mal höher ist. Für HDL wurde gezeigt [110], dass die Vit.E-Uebertragung von der Anwesenheit der übrigen Plasmaproteine unbeeinflusst ist. Die in Ratten gefundene Uebertragung von Vit.E von Lipoproteinen auf EC lässt sich aber nicht auf Menschen übertragen, weil die Lipoprotein-Zusammensetzung dieser beiden Spezies völlig verschieden ist.

Beim Menschen konnte mit Inhibitoren der EC-Glycolyse gezeigt werden, dass die Uebertragung von Vit.E von Plasma auf EC unabhängig von dessen ATP-Produktionssystem ist und dass Plasma- und EC-Vit.E-Spiegel korreliert sind. Durch Uebertragung von lipoproteingebundenem-Vit.E aus Vit.E-reichem Plasma auf Vit.E-arme EC (gewonnen von Abetalipoproteinämie Patienten) wurde gezeigt, dass der grösste Teil des übertragenen Vit.E aus HDL stammt, gefolgt von LDL und VLDL. Eine gewisse Vorsicht bei der Interpretation dieser Befunde ist jedoch angebracht, da während der beschriebenen 5-stündigen Inkubationszeit keine Gleichgewichte zwischen Lipoproteinen und EC erreicht wurden.

Deshalb wurde die Uebertragung von in vitro an menschliche Lipoproteine gebundenem markiertem Vit.E auf humane EC unter Gleichgewichtsbedingungen untersucht.

| Versuchsbedingungen |                             |                                                     | Uebertragung von Vit.E<br>von LP auf EC      |                                      |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------|
|                     | [LP] <sub>exp.</sub><br>g/l | [ <sup>3</sup> H-Vit.E] <sub>LPgeb.</sub><br>µMol/l | Max.Uebertrag.<br>in % des LP-<br>geb. Vit.E | Verteilungs-<br>Koeffizient<br>LP/EC |
| VLDL                | 1.5-1.95                    | 0.3-0.7                                             | 44%                                          | 1.3                                  |
| LDL                 | 4.0-7.7                     | 0.6-1.0                                             | 40%                                          | 1.5                                  |
| HDL                 | 2.7-4.8                     | 3.0-4.5                                             | 24%                                          | 3.2                                  |
| *                   | I                           | II                                                  | III                                          | IV                                   |

Tab.16: Gleichgewicht von markiertem Vit.E zwischen Lipoproteinen und intakten EC. Die Lipoprotein- und EC-Konzentrationen wurden den natürlichen angepasst. Versuchsbedingungen: siehe Abb.39, VLDL: n=2, LDL,HDL: n=3

Tabelle 16 zeigt, dass bei den Vit.E-Uebertragungs-Experimenten durch Lipoproteine trotz variablen Lipoproteinkonzentrationen (Tab.16,I) und trotz variabler Vit.E-Beladung (Tab.16,II) derselben eine auffallend gleichmässige, nur von der Art des Lipoproteins abhängige Uebertragung des Vit.E auf die EC-Membranen erfolgte. Die prozentualen Uebertragungsraten von Vit.E (Tab.16,III+IV) wurden im Gleichgewicht zwischen Lipoproteinen und EC-Membranen gewonnen und stellen somit ein Mass für die Affinitätsverhältnisse von Vit.E zu Lipoproteinen und EC-Membranen dar. Betrachtet man die gefundenen Verteilungskoeffiziente (Tab.16,IV) für die einzelnen Lipoproteine und deren Konzentration an gebundenem Vit.E, so wird ersichtlich, dass trotz relativ ungünstiger Gleichgewichtslage HDL der wichtigste Ueberträger von Vit.E auf EC-Membranen ist.

Ueber die Art der Vit.E-Uebertragung von Lipoproteinen auf EC lassen sich aufgrund unserer Experimente keine Schlüsse ziehen. Die Tatsache, dass für SA, welches die höchste Uebertragung aufwies, keine Membranrezeptoren in EC-Membranen existieren, fassen wir als Hinweis für eine unspezifische Uebertragung auf. Die Lipoproteinbindung an EC-Membranen wurde als grösstenteils unspezifisch [111] beschrieben, was ebenfalls auf eine unspezifische Uebertragung des Vit.E auf EC-Membranen schliessen lässt.

#### 4.5. Untersuchung der Oxidation von Vit.E im Plasma und in der EC-Membran

Es wird allgemein angenommen, dass Vit.E eine antioxidative Schutzfunktion im menschlichen Körper ausübt. Wir untersuchten daher die Oxidation von Vit.E im Plasma (Serumproteingebunden) und in der EC-Membran (Membrangebunden).

##### 4.5.1. Oxidation von Vit.E im Plasma

Burton et al.[56] bestimmte die antioxidative Kapazität biologischer Materialien durch Messung der Hemmung einer Standard-Peroxidation (Vergleiche 1.2.2.2.). Diese Messung erlaubte die gesamte antioxidative Kapazität von nativem Plasma mit den Konzentrationen der darin enthaltenen reduzierenden Bestandteile zu vergleichen. Daraus ergab sich, dass die totale antioxidative Kapazität des Plasmas sich durch dessen Bestandteile erklären lässt. Vit.E wurde dabei ein Anteil von 6%, Urat von 26% und Vit.C von 1% zugeschrieben. Die restlichen 67% wurden auf Oxidation der leicht oxidierbaren Sulfhydryl- bzw. Hydroxylgruppen zurückgeführt.

Der Anteil des Vit.E am antioxidativen Schutz im Plasma wurde in der vorliegenden Arbeit durch oxidative Belastung des gesamten Plasmas und des serumproteingebundenen Vit.E untersucht. Die Oxidation wurde dabei mit Hilfe des XOD-Systems durchgeführt.

Im nativen Plasma konnte in 2-stündiger Oxidationszeit nur 3-5% des Vit.E oxidiert werden während in einer vergleichbaren mit DOC solubilisierten Vit.E-Lösung mehr als 99% oxidiert wurde (Tab.8). Dies zeigt, dass Vit.E während seines Transportes im Plasma vor Oxidation geschützt ist. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Natur dieses Schutzes des Antioxidans Vit.E im Plasma zu finden. Neben den bereits erwähnten leicht oxidierbaren Substanzen wie Urat, Vit.C und Protein-SH- und OH-Gruppen kommt auch die Plasma-proteinbindung als Schutzprinzip in Frage.

Wir untersuchten daher die Oxidation von Vit.E gebunden an SA und Lipoproteine (VLDL, LDL und HDL) und fanden, dass durch Bindung von Vit.E an SA und Lipoproteine Vit.E größtenteils vor Oxidation geschützt ist (Abb.34,36,Tab.10). Bei SA-gebundenem Vit.E konnte zudem gezeigt werden, dass dieser Schutz auch nach der Oxidation der empfindlichen Protein-SH-gruppen vorhanden blieb (Abb.35). Wir schlossen daraus, dass der Schutz von Vit.E durch Bindung an SA dadurch zustande kommt, dass Vit.E im lipophilen Teil des SA-Moleküls gebunden und für die aus der wässrigen Phase wirkenden Radikale nur schwer zugänglich ist.

Vit.E ist somit während seines Transportes im Plasma durch Bindung an Serumproteine vor Oxidation weitgehend geschützt und übt damit in diesem Kompartiment kaum eine antioxidative Schutzfunktion aus. Erst durch Einbau in Zellmembranen kann es seine antioxidative Wirkung entfalten.

Aufgrund einer Kompartimentierung der Lipoproteine in einen apolaren Kern (Triglyceride, Cholesterinester und Cholesterin) und eine stärker polare Hülle (Phospholipide, Cholesterin und Proteine) und dem beobachteten Schutz des Vit.E vor Oxidation durch Bindung an Lipoproteine leiten wir ab, dass Vit.E vorwiegend im apolaren Kern und nicht in der hydrophilen Hülle transportiert wird. Die Verteilung von Vit.E zwischen der Oberfläche und dem Kern der Lipoproteine ist jedoch nicht bekannt. Den Befund, dass auch lipoprotein-gebundenes Vit.E zum Teil oxidierbar ist und dieser Anteil zwischen den einzelnen Lipoproteinen variiert, interpretieren wir als Ausdruck der variablen Verteilung des lipoprotein-gebundenen Vit.E zwischen Kern (nicht oxidierbar) und der Hülle (oxidierbar) der Lipoproteine.

Die Tatsache, dass lipophile Proteine, die zur unspezifischen Bindung von Vit.E geeignet sind, dieses auch vor oxidativem Angriff zu schützen vermögen, bekommt durch Berücksichtigung der Tatsache, dass membrangebundenes Vit.E mit demselben Oxidationssystem sehr leicht oxidierbar ist, eine besondere Bedeutung.

#### 4.5.2. Oxidation von Vit.E in EC-Membranen

In analoger Weise wie für Plasma wurde auch für Lipidextrakte aus EC-Membranen die antioxidative Kapazität bestimmt [57.58]. Es wurde gezeigt, dass Vit.E das einzige fettlösliche Antioxidans der EC-Membran darstellt. Die Vorstellung, dass Vit.E zwischen den Lipiden der Zellmembran eingelagert ist und diese dadurch vor Radikalangriff zu schützen vermag, ist weitgehend akzeptiert. Der Befund, dass Vit.E wahrscheinlich das bedeutendste Antioxidans der Zellmembranen darstellt, wirft die Frage nach dessen metabolischen Weg auf.

In organischer Lösung wurden verschiedene Vit.E-Oxidationsprodukte hergestellt und identifiziert [74-80,82-86] (Abb.16). Mit Hilfe von wasserlöslichen Vit.E-Modellverbindungen (ohne Phytolseitenkette) konnten einige dieser Produkte (Abb.16) auch in wässrigen Systemen hergestellt werden. Bis heute ist es jedoch nicht gelungen Vit.E-Oxidationsprodukte in Zellmembranen nachzuweisen oder zu bilden.

In EC-Membranen kann Vit.E, wie bereits beschrieben, durch Belastung mit dem XOD-System vollständig oxidiert werden. Auf die dabei gebildeten Produkte wird in einem späteren Abschnitt eingegangen.

Untersuchung der Auswirkungen des XOD-System auf die Membranproteine durch SDS-Gelelektrophorese (Abb.41) zeigte, dass während der Oxidation von Vit.E in EC-Membranen eine zunehmende Proteolyse der Spektrine durch XOD auftrat. Ob die Proteaseaktivität eine Verunreinigung der XOD-Präparate darstellt oder aber eine Aktivität der XOD selbst ist konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeklärt werden. Die Befunde, dass mit verschiedenen XOD-Präparationen gleiche Ergebnisse erhalten wurden (Daten nicht gezeigt) und dass neben des Abbaus der Spektrinbanden keine Fragmentierungen anderer Membranproteine auftraten, sprechen gegen eine Protease-Verunreinigung. Trotz der Tatsache, dass längere Inkubationszeiten von EC-Membranen mit dem XOD-System zur Spaltung einzelner Membranproteine führte, weisen die folgenden Gründe darauf hin, dass die Oxidation von Vit.E in EC-Membranen nicht auf eine Zerstörung der Membranstruktur zurückzuführen ist sondern eine in situ Oxidation darstellt:

- EC-Ghosts sind nach 4-stündiger Oxidation mit dem XOD-System physikalisch intakt.
- Nach 2-stündiger Inkubationszeit mit dem XOD-System ist das Membranproteinmuster noch weitgehend unverändert, während bereits nach einer Stunde 60% des Vit.E oxidiert wurde (Abb.33, 41).
- Inkubation von EC-Membranen mit Metallionen ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) zeigte eine Vit.E-Oxidation jedoch ein intaktes Bandenmuster (Daten nicht gezeigt).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Oxidation von Vit.E in der Zellmembran nicht vom Abbau der Membranproteine abhängt, sondern unabhängig davon auftritt.

In EC-Membranen konnte durch Oxidation mit dem XOD-System eine Vit.E-Abnahme festgestellt werden. Durch chromatographische Trennung des Membranlipidextraktes auf HPLC konnte ein neuer Bestandteil (Abb.40) mit einer Retentionszeit von 11 Minuten (Elutionssystem: 6% Wasser/Methanol) detektiert werden. Durch Oxidation von markiertem Vit.E wurden die in Abbildung 42 dargestellten Oxidationsprodukte erhalten. Dabei konnte wiederum ein Produkt mit der Retentionszeit von 11-Minuten eluiert werden, was darauf hinweist, dass in vivo und in vitro inkorporiertes Vit.E die gleichen Oxidationsprodukte ergibt. Die Menge der gebildeten Oxidationsprodukte war jedoch viel zu gering um eine Strukturanalyse der gebildeten Produkte durchführen zu können. Vergleich der Vit.E-Oxidationsprodukte in DOC mit denen in EC-Membranen (Abb.42) zeigte, dass zumindest ein Teil der Oxidationsprodukte der EC-Membranen im einfachen DOC-Modellsystem semiquantitativ gebildet werden kann.

Die Oxidationsprodukte konnten durch Verwendung eines stärker polaren Elutionsmittels auf HPLC besser getrennt werden (Tab.13, Abb.43). Tabelle 17 zeigt einen Vergleich der in DOC und EC-Membranen gebildeten Oxidationsprodukte.

| EC-Membranen       |      |            | DOC                |      |            |
|--------------------|------|------------|--------------------|------|------------|
| RZ auf HPLC (min.) | Bez. | Stabilität | RZ auf HPLC (min.) | Bez. | Stabilität |
| 10                 | I    | stabil     | -                  | -    | -          |
| 20                 | II   | stabil     | -                  | -    | -          |
| 30                 | III  | unstabil   | 35                 | A    | ?          |
| -                  | -    | -          | 55                 | B    | stabil     |
| 70                 | IV   | unstabil*  | 70                 | C    | unstabil** |
| 90                 | V    | stabil     | 90                 | D    | stabil     |

Tab.17: Vergleich der chromatographisch getrennten Vit.E-Oxidationsprodukte (Elutionssystem: 15% Wasser/Methanol), hergestellt in DOC und EC-Membranen. (RZ=Retentionszeit, Bez.=Bezeichnung der Produkte)

\* Produkt IV zerfällt in ein neues Produkt mit der Retentionszeit von 53 Minuten. (identisch mit B aus DOC)

\*\* Produkt C konnte durch erneute Oxidation in Produkt B übergeführt werden.

Aus Tabelle 17 geht durch Vergleich der Retentionszeiten und der Stabilitäten hervor, dass die Hauptoxidationsprodukte der EC-Membran (IV+V) im einfacheren DOC-Modellsystem (C+D) gebildet werden können.

Durch Vergleich der Kinetik der Bildung der Oxidationsprodukte in DOC und durch Ueberführen des Produktes C durch erneute Oxidation in Produkt B konnte folgende Darstellung der Bildung der Hauptoxidationsprodukte von Vit.E in DOC (Abb.57) erhalten werden.

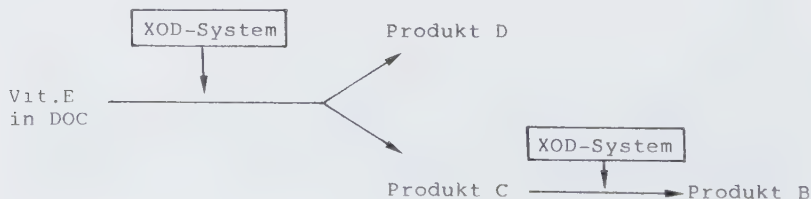


Abb.57: Bildung von Vit.E-Oxidationsprodukten in DOC

Die beiden Hauptoxidationsprodukte konnten im DOC-Modellsystem semiquantitativ gebildet werden und wurden damit der Struktur-Analyse zugänglich. Die Produkte V und D konnten durch Vergleich mit synthetischem Tocopherylchinon (HPLC, UV-Spektroskopie) identifiziert werden. Die Produkte IV und C wurden durch Vergleich der UV-, IR- und NMR-Spektren und durch Massenspektrometrie analysiert und konnten als Epoxy-Tocopherylchinon, das im Gleichgewicht mit seiner Halbace-talform liegt, identifiziert werden (Abb.53). Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 und Abbildung 58 zusammengefasst.

| Produkt in EC-Membranen | Produkt in DOC | Identifiziertes Produkt |
|-------------------------|----------------|-------------------------|
| IV                      | C              | Epoxy-Tocopherylchinon  |
| V                       | D              | Tocopherylchinon        |

Tab.18: Identifizierte Hauptoxidationsprodukte, hergestellt durch Oxidation von Vit.E in DOC und EC-Membranen.

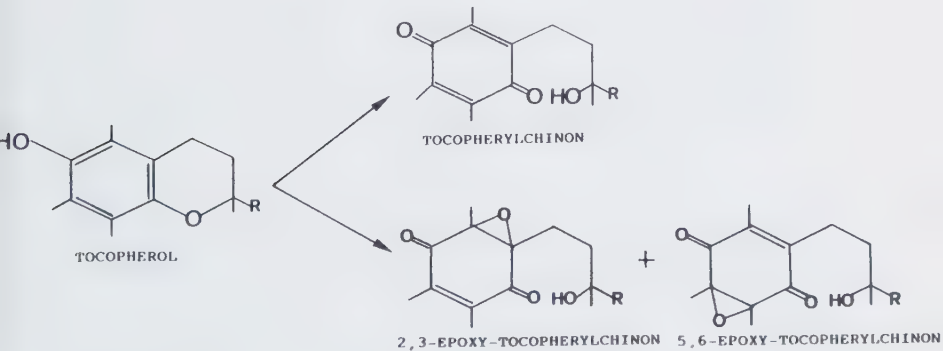


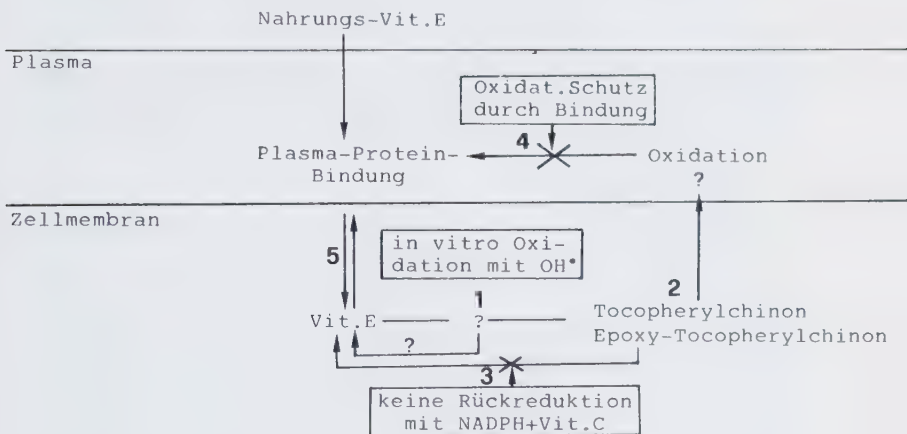
Abb.58: Chemische Struktur, der durch Oxidation von Vit.E in DOC und EC-Membranen hergestellten Oxidationsprodukten.

Durch Einbau von Vit.E in Liposomen konnte gezeigt werden, dass das durch 1-Elektronen-Oxidation entstandene Chromoxylradikal durch Vit.C zum Teil zu Vit.E reduziert werden konnte [68]. Wir überprüften daher die Stabilität unserer 2-Elektronen-Oxidationsprodukte auf eine mögliche Rück-Reduktion zu Vit.E. Abb.54 zeigt, dass Tocopherylchinon (Produkt D) und Epoxy-Tocopherylchinon (Produkt C) weder im Plasma noch in der EC-Membran zu Vit.E reduziert werden konnten. Auch in Anwesenheit von Vit.C als biologischem Reduktionsmittel oder von Methylenblau zur NADPH-Produktionssteigerung konnte eine Reduktion von Vit.E weder im Plasma noch in der EC-Membran erreicht werden. Die 2-Elektronen-Oxidationsprodukte von Vit.E: Tocopherylchinon und Epoxy-Tocopherylchinon stellen somit keine reversible Redox-Produkte von Vit.E in der Zellmembran dar.

## 5. SCHLUSSFOLGERUNGEN

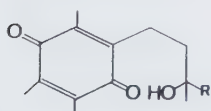
=====

Die anfangs gestellten Fragen konnten abschliessend wie folgt beantwortet werden.

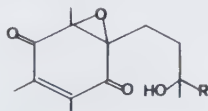


1. Vitamin E konnte in EC-Membranen mit Hilfe der enzymatischen Bildung von Hydroxyl-Radikalen oxidiert werden.

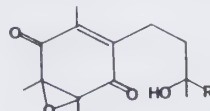
2. Zwei Hauptoxidiationsprodukte der EC-Membran konnten im DOC-Modellsystem isoliert und als Tocopherylchinon und Epoxy-Tocopherylchinon identifiziert werden.



TOCOPHERYLCHINON



2,3-EPOXY-TOCOPHERYLCHINON



5,6-EPOXY-TOCOPHERYLCHINON

3. In EC-Membranen eingebautes Tocopherylchinon und Epoxy-Tocopherylchinon konnte weder von den natürlichen Reduktionssystemen der EC (NADH, NADPH, Glutathion) noch von künstlich zugeführtem Vit.C zu Vit.E reduziert werden.

4. Vit.E wurde im nativen Plasma durch Bindung an Lipoproteine vor Oxidation geschützt. Derselbe Schutz konnte auch bei Serumalbumin erreicht werden.

5. Vit.E konnte zwischen Plasmaproteinen (Lipoproteinen, Serumalbumin) und EC-Membranen ausgetauscht werden. Unter physiologischen Bedingungen war HDL das wichtigste Vit.E-Transportmolekül.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit können in folgenden biologischen und medizinischen Zusammenhang gestellt werden:

Obwohl die bekannten, durch Vit. E-Mangel hervorgerufenen Krankheiten in Mensch und Tier meist auf einen Schutz von Zellmembranen durch Vit.E zurückgeführt wurden, konnten bisher keine Vit.E-Oxidationsprodukte in Zellmembranen nachgewiesen werden.

Dank der Identifikation der zwei Hauptoxidationsprodukte von Vit. E in isolierten EC-Membranen und der damit erhaltenen Kenntnis deren physikalischen und chemischen Eigenschaften, ergibt sich die Möglichkeit, in verschiedenen Geweben und Zellen gezielt nach in vivo gebildeten Oxidationsprodukten zu suchen.

In frisch gewonnenen EC von Gesunden blieb diese Suche bisher erfolglos, was die folgenden Möglichkeiten offen lässt:

1. In vivo werden die in vitro gefundenen Oxidationswege nicht beschritten. Wie bereits erwähnt, wäre die reversible Bildung von Chromanoxylradikalen eine solche Möglichkeit. Versuche an Liposomen zeigten jedoch, dass zwar ein Teil der gebildeten Oxidationsprodukte durch wasserlösliche Antioxidantien rückreduziert werden kann, dass jedoch gleichzeitig irreversible Oxidationsprodukte in der Lipidschicht entstehen. Es darf deshalb vermutet werden, dass die Abwesenheit von Vit.E-Oxidationsprodukten in der Membran frischer EC nicht durch andere, der Entdeckung entgangene Oxidationsmechanismen, erklärt werden müssen.
2. Frische EC weisen Oxidationsprodukte von Vitamin E möglicherweise in einer, für die angewandte Analystechnik, zu geringen Konzentration auf. In älteren EC-Populationen wurde eine Vernetzung von Membrankomponenten beobachtet, der wahrscheinlich primär die Oxidation von Vit.E voranging. Deshalb müssten anstelle frischer EC, Zellen untersucht werden, die stärkerer oder längerer oxidativer Belastung ausgesetzt waren. Die Untersuchung von alten Erythrocyten oder von Zellen von Patienten die oxidierenden Substanzen ausgesetzt waren (z.B. Sauerstoff, Eisen, Phenacetin), wären somit in Zukunft ein sehr geeignetes Untersuchungsobjekt.
3. Es besteht zudem die Möglichkeit, dass Vit. E Oxidationsprodukte in vivo zwar in gleicher Art gebildet werden, wie die in vitro Versuche an EC gezeigt haben, dass jedoch ein rascher Abtransport aus der Zellmembran deren Akkumulation verhindert. Ein Transport dieser Produkte im Plasma ist hypothetisch, doch weist die gegenüber Vit.E höhere Polarität der Oxidationsprodukte auf eine Bindungs- und

Transportmöglichkeit hin. Im Tierexperiment konnte Tocopherylchinon, das auch ein Hauptoxidationsprodukt unserer oxidativen Studien darstellt, aus der Leber von Ratten isoliert werden, was wiederum auf die Möglichkeit hinweist, dass der Abtransport mit Plasmaproteinen und damit wahrscheinlich die Ausscheidung die Erklärung für das Fehlen von Vit.E-Oxidationsprodukten in frischen EC-Membranen darstellt.

4. Eine weitere Erklärung für die erfolglose Suche nach Oxidationsprodukten wäre auch, dass EC die Vit.E-Oxidationsprodukte enthalten und dadurch wahrscheinlich auch teilweise einer Lipidperoxidation ausgesetzt wurden, von der Milz sofort eliminiert und damit unserer Detektion entzogen wurden.

Diese diskutierten Möglichkeiten weisen darauf hin, dass nun gezielte Untersuchungen in anderen Geweben und Zellpopulationen durchgeführt werden müssen.

Ein weiterführender Aspekt der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liegt in der reversiblen Bindungsfähigkeit von Vit. E an Serumalbumin.

Tocopherol ist als Trockensubstanz zur oralen, oder parenteralen Verabreichung als wässrige Suspension mit einem Lösungsvermittler im Handel erhältlich. Die wichtigsten Patientengruppen, die einer Vit. E - Substitution bedürfen weisen eine Fett-Malabsorption auf (siehe 1.1.3.), welche eine orale Verabreichung erschwert. Die Anwesenheit eines chemischen Solubilisators in den parenteralen Präparationen führte zu einem erhöhten Unverträglichkeits-Risiko. Todesfälle nach intravenöser Gabe von Vit. E wurden bekannt und auf diesen Umstand zurückgeführt [114]. Sie haben zum Rückzug der intravenösen Applikationsform geführt.

Humanes Serumalbumin steht in reiner Form und genügender Menge zur Verfügung. Schwere Unverträglichkeitsreaktionen sind bisher nicht bekannt geworden, so dass es als Träger-substanz für Vitamin E nutzbar sein könnte. Die Tatsache, dass Vit.E leicht von SA auf EC-Membranen übertragen werden kann, lässt, zusammen mit unserem Ergebnis, dass in vivo und in vitro eingebautes Vit.E die gleichen Oxidationsprodukte ergibt, vermuten, dass auf diesem Weg zugeführtes Tocopherol biologisch verwertbar ist. Unter diesen Voraussetzungen scheint die gefundene Vitamin-E Bindung an Serumalbumin eine Grundlage für ein neues intravenöses Vitamin E Präparat darzustellen.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

=====

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel die Oxidation von Vitamin E, die in organischen Lösungsmitteln gut untersucht ist, in biologischen Systemen zu verfolgen. Dazu musste ein unter physiologischen Bedingungen wirksames Oxidationssystem sowie ein für das lipophile Vitamin E geeignetes Milieu gefunden werden.

Als Oxidationsmittel wurden Schwermetalle ( $\text{Fe}^{+++}$  und  $\text{Cu}^{++}$ ) sowie kontinuierlich erzeugte Hydroxyl-Radikale untersucht. Die letzteren wurden mit einer durch Xanthinoxidase katalysierten Redoxreaktion zwischen Xanthin und Sauerstoff unter Mitwirkung von  $\text{Fe}^{+++}$ -Ionen produziert und erwiesen sich als geeignet zur Oxidation von Vitamin E bei neutralem pH in verdünnter wässriger Lösung.  $\text{Cu}^{++}$  und  $\text{Fe}^{+++}$  zeigten bei neutralem pH aufgrund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit eine geringere oxidative Wirkung und wurden nicht weiter verfolgt. Zur Solubilisierung des wasserunlöslichen Vitamin E bedienten wir uns der bekannten Tatsache, dass es in vivo an Serumlipoproteine gebunden transportiert wird, und dass Serumalbumin ein unspezifisches Trägerprotein für lipophile Moleküle darstellt. Die Oxidationskinetik und die gebildeten Oxidationsprodukte von Vitamin E wurden deshalb in den folgenden drei Systemen untersucht:

- solubilisiert mit einem ionischen Detergens (Deoxycholat)
- gebunden an Serumalbumin und Lipoproteine
- eingebaut in Erythrocyten-Membranen

Die Resultate zeigen, dass Vitamin E durch Bindung an Serumalbumin, unabhängig von der Oxidation der Protein-SH-Gruppen, oder durch Bindung an seine physiologischen Transportmoleküle, den Lipoproteinen, vor Oxidation durch Hydroxyl-Radikale geschützt ist. Dieser Schutz liess sich auch im nativen Plasma nachweisen. Vitamin E in Erythrocyten-Membranen oder solubilisiert in Deoxycholat ist jedoch für dasselbe Oxidationssystem gut zugänglich.

Die Resultate weisen darauf hin, dass Vitamin E durch Einlagerung im lipophilen Kompartiment von Serumalbumin oder im apolaren Kern der Lipoproteine der Oxidation mit den aus der wässrigen Phase wirkenden Radikalen nur schwer zugänglich ist.

Es kann daraus der physiologisch sinnvolle Zusammenhang abgeleitet werden, dass Vitamin E während seines Transportes im Plasma vor Oxidation geschützt ist, aber an seinem Wirkungsort, der Zellmembran, seine antioxidative Wirkung zum Schutz der Lipide entfalten kann, indem es in Membranen oxidiert wird.

Die Bildung von Vitamin E-Oxidationsprodukten konnte nur in Abwesenheit der wasserlöslichen Antioxidantien des Erythrocyten wie Hämoglobin, Glutathion, Superoxiddismutase, Katalase und Peroxidasen nachgewiesen werden.

Dies zeigt, dass im wässrigen Milieu gebildete Oxidantien primär von den wasserlöslichen Antioxidantien eliminiert werden, und dass Vitamin E erst sekundär, oder bei direkter Bildung der oxidierenden Radikale im Lipidkompartiment, was hier nicht untersucht werden konnte, als Antioxidans auftritt.

Die Uebertragung von Vitamin E auf Erythrocyten wurde an Serumalbumin- und lipoproteingebundenem Vitamin E studiert. Bei lipoproteingebundenem Vitamin E konnte ein Gleichgewicht zwischen den einzelnen Lipoproteinen und der Erythrocyten-Membran erreicht werden. Dabei zeigte es sich, dass High density lipoprotein, trotz ungünstiger Gleichgewichtslage, aufgrund seiner hohen Plasmakonzentration der wichtigste Ueberträger von Vitamin E in vivo ist. Obschon an natürlichem Serumalbumin kein Vitamin E gebunden ist, liess es sich in vitro zur Uebertragung von Vitamin E auf Erythrocyten verwenden. Unter den untersuchten Bedingungen wurde - im Gegensatz zu den Lipoproteinen - mit Serumalbumin kein Gleichgewicht erreicht. Vitamin E konnte praktisch vollständig von Serumalbumin auf Erythrocyten übertragen werden, wofür die geringere Affinität von Serumalbumin für Vitamin E verantwortlich gemacht wird. Serumalbumin stellt somit ein ausgezeichnetes System zur Uebertragung von Vitamin E auf Erythrocyten dar. Derart gebundenes Vitamin E eignet sich zur Substitution von Patienten mit Vitamin E-Mangel die aufgrund einer Fettmalabsorption oral zugeführtes Vitamin E nicht gut resorbieren können. Die gefundene Vitamin E-Uebertragung mit Serumalbumin scheint deshalb eine Grundlage für ein intravenöses Vitamin E-Präparat darzustellen, mit dessen Hilfe Vitamin E in Zukunft in viel kleineren Dosen verabreicht werden könnte.

Um den Weg von Vitamin E an seinem biologischen Wirkungsort, der Zellmembran, zu verfolgen, wurden einerseits Oxidationsreaktionen an in Erythrocyten-Membranen eingebrachtem Vitamin E und andererseits das Schicksal künstlich hergestellter und in Membranen eingebauter Vitamin E-Oxidationsprodukte untersucht. Es gelang, zwei Hauptoxidationsprodukte von Vitamin E, die in Erythrocyten-Membranen nur in analytischen Mengen gebildet wurden, in einem Modell-System herzustellen und zu reinigen. Mit UV-, IR-, NMR- und Massenspektrometrie konnten Tocopherylchinon und Epoxy-Tocopherylchinon als wichtigste in situ gebildete Vitamin E-Oxidationsprodukte identifiziert werden.

Durch Einbau der genannten, aus radioaktiv markiertem Vitamin E hergestellten, Oxidationsprodukte in Membranen intakter Erythrocyten wurde eine Rückreduktion zu Vitamin E und damit ein geschlossener Kreislauf des Antioxidans untersucht. Weder spontan noch durch Exposition der Erythrocyten an Ascorbinsäure, die als Vitamin E regenerierende Substanz diskutiert wurde, noch durch Stimulation des Hexosemonophosphat-Weges der Erythrocyten durch Methylenblau, konnte eine Rückreduktion der artifiziellen Oxidationsprodukte zu Vitamin E induziert werden.

Dank der Identifizierung der zwei Hauptoxidationsprodukte von Vitamin E in isolierten Erythrocyten-Membranen und der damit erhaltenen Kenntnis deren physikalischen und chemischen Eigenschaften, ergibt sich die Möglichkeit, in verschiedenen Geweben und Zellen gezielt nach in vivo gebildeten Oxidationsprodukten zu suchen. In frisch gewonnenen Erythrocyten von Gesunden blieb diese Suche bis jetzt erfolglos. Diesen Befund, zusammen mit der Tatsache, dass aufgrund der bekannten oxidativen Wirkung von Vitamin E in Zellmembranen Oxidationsprodukte zu erwarten sind, werten wir als Hinweis, dass diese Oxidationsprodukte in gesunden menschlichen Erythrocyten in zu geringer Konzentration gebildet werden, oder dass sie durch Abtransport und Ausscheidung eliminiert werden. Es müssen deshalb anstelle frischer Erythrocyten Zellen untersucht werden, die einer stärkeren oder längeren oxidativen Belastung ausgesetzt waren. Zudem wird es wichtig werden, Ausscheidungswege für Vitamin E-Oxidationsprodukte zu suchen.

## 6. DANK

=====

In erster Linie danke ich Herrn Dr. P. Tuchschnid ganz herzlich für die Ueberlassung des interessanten Themas, für die dauernde Unterstützung, sowie für die wertvollen Diskussionen und Anregungen. Herrn F. Rieser danke ich besonders für seine tatkräftige Mithilfe bei der Planung und Durchführung der experimentellen Arbeiten, sowie für seine stete Bereitschaft technische Probleme zu lösen. Herrn Prof. R. Humbel bin ich für die Durchsicht des Manuskriptes sowie für seine wertvolle Kritik und Anregungen sehr dankbar. Im weiteren danke ich Herrn Prof. G. Duc ganz herzlich für sein grosses Interesse an meiner Arbeit und für seine stete Unterstützung. Herrn Dr. M. Acemoglu möchte ich für die Aufnahme der IR- bzw. NMR-Spektren und für die Interpretation der spektroskopischen Daten herzlich danken. Herrn Dr. N. Blau und Herrn W. Staudenmann bin ich für die Aufnahme und Besprechung der Massenspektren sehr dankbar. Herrn Dr. K. Pfister danke ich herzlich für seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei der Lösung von Problemen.

Zum Schluss möchte ich allen Mitarbeitern des Neonatologie- und Stoffwechsellabors für das ausgezeichnete Arbeitsklima und die Mithilfe am Gelingen meiner Arbeit danken.

Diese Arbeit wurde finanziell durch den schweizerischen Nationalfonds (Projekt-Nr.: 3.983.0.82 / 3.989.0.84) unterstützt.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

=====

- 1 Stepp, W., Kühnau, J.  
Die Vitamine und ihre klinische Anwendung  
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart (1957)
- 2 Burton, G.W., Cheeseman, K.H., Doba, T., Ingold, K.U.,  
Slater, T.F., Biologie of Vit.E, Pitman Books, London  
(Ciba Foundation Symposium 101) p 4-18, (1983)
- 3 Vitamin-Compendium  
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG Basel (1980)  
2. revidierte Auflage
- 4 Hassan, H. et al.  
Am. J. Clin. Nutr. 19: 145-156 (1966)
- 5 Oski, F.A., Barness, L.A.  
J. Pediat. 70: 211-220 (1976)
- 6 Hittner, H.M. et al.  
N. Engl. J. Med. 305: 1365-1372 (1981)
- 7 Ehrenkranz, R.A. et al.  
N. Eng. J. Med. 299: 565-569 (1978)
- 8 Behrens, W.A., Madere, R.  
Nutr. Res. 5: 167-174 (1985)
- 9 Behrens, W.A., Thomson, J.N., Madere, R.  
Amer. J. Clin. Nutr. 35: 691-696 (1982)
- 10 Ciba-Geigy-Tabelle  
8., revidierte und erweiterte Auflage (1979)
- 11 Takahashi, Y., Uruno, K., Kimura, S.  
J. Nutr. Sci. Vitaminol 23: 201-209 (1977)
- 12 Srivastava, S., Phadke, R.S., Govil, G., Rao, C.N.R.  
Biochim. Biophys. Acta 734: 353-362 (1983)
- 13 Erin, A.N., Spirin, M.M., Tabidze, L.V., Kagan, V.E.  
Biochim. Biophys. Acta 774: 96-102 (1984)

- 14 Perly, B., Burton, G.W.  
Biochim. Biophys. Acta 819: 131-135 (1985)
- 15 Kitabchi, A.E., Wimalasena, J.  
Biochim. Biophys. Acta 684: 200-206 (1982)
- 16 Wimalasena, J., Michael, D., Kitabchi, A.E.  
Biochem. Pharmacol. 31: 3455-3461 (1982)
- 17 Kitabchi, A.E., Wimalasena, J.  
Annals New York Academy of Sciences 393: 300-314 (1982)
- 18 Kitabchi, A.E., Wimalasena, J., Barker, J.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 96: 1739-1746 (1980)
- 19 Cushley, R.J., Forrest, B.J.  
Can. J. Chem. 55: 220-226 (1977)
- 20 Cushley, R.J., Forrest, B.J., Gillis, A., Tribe, J.  
Can. J. Chem. 57: 458-465 (1979)
- 21 Srivastava, S., Phadke, R.S., Govil, G., Rao, C.N.R.  
Biochim. Biophys. Acta 734: 353-362 (1983)
- 22 Diplock, A.T., Lucy, J.A., Verrinder, M., Zieleniewski, A.  
Febs. Lett. 82: 341-344 (1977)
- 23 Stillwell, W., Bryant, L.  
Biochim. Biophys. Acta 731: 483-486 (1983)
- 24 Pohlmann, F.W., Kuiper, P.J.C.  
Phytochemistry 20: 1525-1528 (1981)
- 25 Fukuzawa, K., Ikeno, H., Tokumura, A., Tsukatani, H.  
Chem. Phys. Lipids 23: 13-22 (1979)
- 26 Massey, J.B., Hoyan, S.S., Pownall, H.J.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 106: 842-847 (1982)
- 27 Lai, M., Duzgunes, N., Szoka, F.C.  
Biochemistry 24: 1646-1653 (1985)

- 28 Wassall, S.R., Thewalt, J.L., Wong, L., Gorrissen, H.,  
Cushley, R.J.  
Biochemistry 25: 319-326 (1986)
- 29 De Gier, J., Mandersloot, J.G., Van Deeneu, L.L.M.  
Biochim. Biophys. Acta 150: 666-675 (1968)
- 30 Haber, F., Weiss, J.  
Proc. R. Soc. Lond. A 147: 332-351 (1934)
- 31 Girotti, A.W., Thomas, J.P.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 118: 474-480 (1984)
- 32 Kellogg, E.W., Fridovich, I.  
J. Biol. Chem. 252: 6721-6728 (1977)
- 33 Kellogg, E.W., Fridovich, I.  
J. Biol. Chem. 250: 8812-8817 (1975)
- 34 Girotti, A.W., Thomas, J.P.  
J. Biol. Chem. 259: 1744-1752 (1984)
- 35 Koster, J.F., Slee, R.G.  
Biochim. Biophys. Acta 752: 233-239 (1983)
- 36 Pryor, W.A., Stanley, J.P., Blair, E.  
Lipids 11: 370-379 (1976)
- 37 Pryor, W.A., Stanley, J.P.  
J. Org. Chem. 40: 3615-3617 (1975)
- 38 Chan, P.C., Peller, O.G., Kesner, L.  
Lipids 17: 331-337 (1982)
- 39 Pryor, W.A., Stanley, J.P., Blair, E.  
Lipids 11: 370-379 (1976)
- 40 Lubin, B., Chiu, D.  
Pediatr. Res. 16: 928-932 (1982)
- 41 Schuurhuis, G.J., Hommes, J., Vos, J., Molenaar, I.,  
Könings, A.W.I.  
Int. J. Radial. Biol. 45: 159-177 (1984)

- 42 Todo, T., Yonei, S., Kato, M.  
Radial. Res. 89: 408-419 (1982)
- 43 Fuller, G.M., Boughter, J.M., Morazzani, M.  
Biochemistry 13: 3036-3041 (1974)
- 44 Jain, S.K., Hochstein, P.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 92: 247-254 (1980)
- 45 Hochstein, P., Jain, S.K.  
Federation Proceedings 40: 183-188 (1981)
- 46 Jain, S.K., Yip, R., Hoesch, R.M., Parmanik, A.K.,  
Dallman, P.R., Shohet, S.B.  
Amer. J. Clin: Nutr. 37: 26-30 (1983)
- 47 Bruch, R.C., Thayer, W.S.  
Biochim. Biophys. Acta 733: 216-222 (1983)
- 48 Brownlee, N.R., Huttner, J.J., Panganamala, R.V.,  
Cornwell, D.G.  
J. Lipid Res. 18: 635-644 (1977)
- 49 Jain, S.K.  
Biomed. Biochim. Acta 42: 43-47 (1983)
- 50 Jain, S.K.  
J. Clin. Invest. 76: 281-286 (1985)
- 51 Mino, M., Sugita, K.  
"Tocopherol, Oxygen and Biomembranes" ed. by C. de Duve  
and O. Hayaishi, Elsevier, Amsterdam (1978)
- 52 Fridovich, I.  
"Free Radicals in Biology" ed. W.A. Pryor  
Academic Press N.Y., 1: 239-277 (1976)
- 53 Hoekstra, W.A.  
"Trace Element Metabolism in animals" ed. W.A. Hoekstra  
et al., University Park Press, Baltimore 61-77 (1973)

- 54 Little, C., O'Brien, P.J.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 31: 145-149 (1968)
- 55 Burton, G.W., Ingold, K.U.  
J. Am. Chem. Soc. 103: 6472-6477 (1981)
- 56 Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Locke, S.  
Febs. Lett. 187: 33-37 (1985)
- 57 Burton, G.W., Joyce, A., Ingold, K.U.  
The Lancet p. 327 (1982)
- 58 Burton, G.W., Joyce, A., Ingold, K.U.  
Arch. Biochem. Biophys. 221: 281-290 (1983)
- 59 Mahoney, L.R., Korcek, S., Hoffman, S., Willermet, P.A.  
Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev. 17: 250-255 (1978)
- 60 Bascetta, E., Gunstone, F.D., Walton, J.C.  
Chemistry and Physics of Lipids 33: 207-210 (1983)
- 61 Packer, J.E., Slater, T.F., Willson, R.L.  
Nature (Lond.) 278: 737-738 (1974)
- 62 Niki, E., Tsuchiya, J., Tanimura, R., Kamiya, Y.  
Chem. Lett. 789-792 (1982)
- 63 Tsuchiya, J., Yamada, T., Niki, E., Kamiya, Y.  
Bull. Chem. Soc. Jpn. 58: 326 (1985)
- 64 Leung, H.W., Vang, M.J., Mavis, R.D.  
Biochim. Biophys. Acta 664: 266-272 (1981)
- 65 Niki, E., Saito, T., Kawakami, A., Kamiya, Y.  
J. Biol. Chem. 259: 4177-4182 (1984)
- 66 Cort, W.M.  
J. Am. Oil Chem. Soc. 51: 321-325 (1974)
- 67 Tsuchiya, J., Niki, E., Kamiya, Y.  
Bull. Chem. Soc. Jpn. 56: 229-232 (1983)

- 68 Niki, E., Kawakami, A., Yamamoto, Y., Kamiya, Y.  
Bull. Chem. Soc. Jpn. 58: 1971-1975 (1985)
- 69 Scarpa, M., Rigo, A., Maiorino, M., Ursini, F.,  
Gregolin, C.  
Biochim. Biophys. Acta 801: 215-219 (1984)
- 70 Haenen, G.R.M.M., Bast, A.  
Febs. Lett. 159: 24-28 (1983)
- 71 Yang, N.Y.J., Desai, I.D.  
"Tocopherol, Oxygen and Biomembranes" ed. by C.de Duve  
and O. Hayaishi, Elsevier, Amsterdam p.233-245 (1978)
- 72 Ivanov, I.I.  
Mol. Biol. 18: 416-426 (1984)
- 73 Ozawa, T., Hanaki, A.  
Biochemistry International 6: 685-692 (1983)
- 74 Svanholm, U., Bechgaard, K., Parker, V.D.  
J. Am. Chem. Soc. 96: 2409-2413 (1974)
- 75 Ozawa, T., Hanaki, A.  
Biochim. Biophys. Res. Commun. 126: 873-878 (1985)
- 76 Yagi, K., Yamada, H., Nishikimi, M.  
"Tocopherol, Oxygen and Biomembranes" ed. by C.de Duve  
and O. Hayaishi, Elsevier, Amsterdam p.1-11
- 77 Nishikimi, M., Yamada, H., Yagi, K.  
Biochim. Biophys. Acta 627: 101-108 (1980)
- 78 Winterle, J., Dulin, D., Mill, T.  
J. Org. Chem. 49: 491-495 (1984)
- 79 Drummond, C.J., Grieser, F.  
Biochim. Biophys. Acta 836: 275-278 (1985)
- 80 Lambelet, P., Löliger, J.  
Chemistry and Physics of Lipids 35: 185-198 (1984)

- 81 Niki, E., Kawakami, A., Saito, M., Yamamoto, Y.,  
Tsuchiya, J., Kamiya, Y.  
J. Biol. Chem. 260: 2191-2196 (1985)
- 82 Nutrition Reviews 39: 285-287 (1981)
- 83 Csallany, A.S., Draper, H.H., Shah, S.N.  
Arch. Biochem. Biophys. 98: 142-145 (1962)
- 84 Foote, C.S., Clough, R.L, Bartley, G.Y.  
"Tocopherol, Oxygen and Biomembranes"ed.by C.de Duve  
and O. Hayaishi, Elsevier, Amsterdam (1978)
- 85 Grams, G.W., Eskins, K., Inglett, G.E.  
J. Am. Chem. Soc. 94: 866-868 (1972)
- 86 Grams, G.W., Eskins, K.  
Biochemistry 11: 606-608 (1972)
- 87 Simon, E.S., Gross, C.S., Milhorat, A.T.  
J. Biol. Chem. 221: 797-805 (1956)
- 88 Simon, E.S., Eisengart, A., Sundheim, L.,Milhorat, A.T.  
J. Biol. Chem. 221: 807-817 (1956)
- 89 Draper, H.H., Saari Csallany, A.  
Federation Proceedings 28: 1690-1695 (1969)
- 90 Weber, F., Wiss, O.  
Helv. Physiol. Acta 21: 131 (1963)
- 91 Rieser, F., Tuchschnid, P.  
Vit.E determination in human plasma and red cell  
membranes. (In preparation)
- 92 De Leenheer, A.P.  
Clinical Chemistry 24: 585-590 (1978)
- 93 Kayden, H.J., Bjornson, L.K.  
Annals N.Y. Academy of Sciences 203: 127-140 (1972)

- 94 Tuchs Schmid, P., Boutellier, U., Koller, E., Duc, G.  
Pediatr. Res. 15: 28-33 (1981)
- 95 Lowry, O.H., et al  
J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)
- 96 Ellman, G.L.  
Arch. Biochem. Biophys. 82: 70 (1959)
- 97 Fairbanks, G. et al  
Biochemistry 10: 2606 (1971)
- 98 Lämml i, U.K.  
Nature 227: 680-685 (1970)
- 99 Maurer, H.R.  
"Electrophoresis and related Technics of Polyacrylamid  
Gel-Elektrophoresis." De Gruyter, Berlin (1976)
- 100 Seidel, D. et al  
Klinische Chemie 19: 737-739 (1973)
- 101 Ciba-Geigy Tabellen, 7. Auflage, 495-511 (1968)
- 102 Bohl ers, H.  
Klin. Päd. 190: 226-232 (1978)
- 103 Vitamin I (Fettlösliche Vitamine)  
Isler, O., Brubacher, G.,  
Georg Thime Verlag Stuttgart (1982)
- 104 Biochemie  
Jungermann, K., Möhler, H.  
Springer-Verlag Berlin (1980)
- 105 Tappel, A.L.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 205: 12-28 (1972)
- 106 Mc Cord, J.M., Day, E.D.  
Febs Lett. 86: 139-142 (1978)
- 107 Halliwell, B.  
Febs Lett. 92: 321-326 (1978)

- 108 Schneider, H., Morrod, R.S., Colvin, J.R., Tatrie, N.H.  
Chem. Phys. Lipids 10: 328-353 (1973)
- 109 Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B.  
Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie  
Georg Thime Verlag, Stuttgart (1979)
- 110 Bjornson, K.L., Gniewkowski, CH., Kayden, H.J.  
J. Lipid Res. 16: 39-53 (1975)
- 111 Assmann, G.  
Lipidstoffwechsel und Atherosklerose  
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1982)
- 112 Clough, R.L., Yee, B.G., Foot, C.S.  
J. Am. Chem. Soc. 101: 683-686 (1979)
- 113 Sheetz, M., Singer, S.  
J. Cell. Biol. 73: 638 (1977)
- 114 Bodenstein, C.J.  
Pediatrics 73: 733 (1984)

## CURRICULUM VITAE

---

Name: Gabriela Rosmarie Baitella-Eberle  
Bürgerort: Zürich, CH  
Geburtsdatum: 3. Juni 1957 in St. Gallen

### Ausbildung:

1973-1977 Besuch des Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Gymnasiums an der Kantonsschule Zürich Oerlikon.  
Herbst 1977 Matura des Typus C

1977-1979 Studium der Biologie an der Universität Zürich.

1979-1983 Studium der Biochemie an der Universität Zürich.  
Februar 1983 Diplom in Biochemie

1983-1986 Assistentin im Neonatologie-Labor der Universitäts-Kinderklinik. Ausführung der Dissertation unter der Leitung von Herrn Dr. med. P. Tuchschnid.

Bei den folgenden Dozenten der Universität Zürich besuchte ich Vorlesungen, Übungen und Kurse:

R. Bachhofen, E. Batschelet, W. Berchtold, J. Biegert, M.A. Billeter, H. Binz, H.R. Bosshard, E. Brun, H. Burla, Ph. Christen, Ch. Cook, H.C. Curtius, A. Dreiding, E. Dübler, A. Dübendorfer, CH. Eugster, H. Fischer, J.A. Fischer, H. Gehring, B. Gutte, H. Heimgartner, M. Hesse, H.R. Hohl, J.R. Huber, R. Humbel, R. Jaussi, J. Kägi, P. Köhler, W. Kündig, K. Lerch, J. Müller, H.R. Oswald, R. Parish, W.v. Philipsborn, H. Ramseier, D. Rast, H. Rieber, P. Rüegg-egger, W. Schaffner, M.C. Schaub, Ch. Schlatter, H.R. Schwarz, A. Steiner, J.D. Tacier, M. Viscontini, G. Wagniere, H. Wanner, H. Weber, Ch. Weissmann, K. Wilson, V. Ziswiler.









